

Vol. 19, No. 2

MARCH, 1934

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hosen; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TABOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUI SUYEOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo
KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by

TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

ÜBER DIE SPALTUNG DES CHOLINS IM ORGANISMUS.

VON

KUNI TODA.

(Aus dem chemischen Institut der medizinischen Akademie für Frauen, Tokyo. Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 2. September, 1933)

EINLEITUNG.

In meiner vorhergehenden Mitteilung (1932) konnte ich über die auffallend vermehrte Ausscheidung des Harnmethylamins nach Betainfütterung berichten. Da die damaligen Untersuchungen auch für die Möglichkeit der Ausscheidungsvermehrung desselben nach Cholinfütterung zu sprechen schienen, stellte ich zuerst Tierversuche an, und führte dann Untersuchungen über die Methylaminbildung aus Cholin im Organewebe aus.

UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Der Kaninchenharn wurde in einem mit verdünnter Salzsäure beschickten Gefäß aufgefangen und auf ein bestimmtes kleines Volumen eingeeengt (meist 100 ccm). Ein aliquoter Teil dieser stark eingeengten Flüssigkeit wurde einer Durchlüftung nach Folin in der Kälte unterworfen. Die übergehenden Basen wurden in doppelt-normaler Salzsäure aufgefangen, das Destillat zum Trocknen gebracht. Das gewonnene weisse Pulver stellt ein Gemenge von Salmiak und Methylaminchlorhydrat dar. In den Versuchen mit Organbrei wurde das Material zuerst der Enteiweissung nach Folin und Wu unterworfen, und die gewonnene wässrige Lösung in gleicher Weise wie im oben erwähnten Verfahren behandelt.

Zur quantitativen Bestimmung des Methylamins wurde die Mikromethylaminbestimmung nach Pregl, modifiziert nach Friedrich (1930), in aliquoten Teilen des Gemenges von Salmiak

und Methylaminchlorhydrat ausgeführt, und aus den erhaltenen Werten der Methylamingehalt ermittelt.

A. HARNVERSUCHE.

Um die Menge des gebildeten Methylamins im Harn nach Cholindarreicherung festzustellen, wurden Injektionsversuche an Kaninchen unternommen, und zwar wurde für die Injektion das Lezithin gewählt. Den Kaninchen, welche mit normaler Kost gefüttert worden waren, wurden 2 g Lezithin in Emulsion intravenös injiziert, und dann wurde die zweitägige Harnmenge analysiert. Zur Kontrolle wurde der Methylamingehalt des normalen Kaninchenharns bestimmt.

Analytische Belege.

I). Normalharn (gewöhnliche Kost).

Der 48-Stundenharn wurde bei salzsauer Reaktion auf 100 ccm konzentriert.

Bestimmung des Methylamins.

Kaninchen I.

Versuch 1.

50 ccm des konzentrierten Harns, der Tagesmenge entsprechend, wurden nach Folin durchlüftet. Es wurden erhalten 0,184 g $\left\{ \begin{smallmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{smallmatrix} \right.$ in der Tagesmenge.

18,285 mg des Gemenges von Salmiak und Methylaminchlorhydrat lieferten 2,388 mg AgJ; folglich 3,346 mg CH_3NH_2 für die Tagesmenge.

Versuch 2.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet; 0,176 g $\left\{ \begin{smallmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{smallmatrix} \right.$ für die Tagesmenge erhalten.

19,330 mg dieses Gemenges lieferten 3,175 mg AgJ; folglich 3,482 mg CH_3NH_2 für die Tagesmenge.

Versuch 3.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet; 0,319 g $\left\{ \begin{smallmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{smallmatrix} \right.$ für die Tagesmenge erhalten.

20,710 mg dieses Gemenges lieferten 1,418 mg AgJ; die Tagesmenge beträgt folglich 2,900 mg CH_3NH_2 .

Kaninchen II.

Versuch 1.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet; 0,228 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ für die Tagesmenge.

19,980 mg dieses Gemenges lieferten 3,520 mg AgJ; die Tagesmenge beträgt folglich 4,997 mg CH_3NH_2 .

Versuch 2.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet; 0,300 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ für die Tagesmenge.

19,722 mg dieses Gemenges lieferten 1,405 mg AgJ; die Tagesmenge beträgt folglich 2,832 mg CH_3NH_2 .

Versuch 3.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet; 0,267 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ für die Tagesmenge.

20,028 mg dieses Gemenges lieferten 0,422 mg AgJ; die Tagesmenge beträgt folglich 0,714 mg CH_3NH_2 .

II). *Lezithininjektionsharn* (gewöhnliche Kost).

a) 2 g Lezithin wurden intravenös injiziert. Der 48-Stundenharn wurde auf 100 ccm eingeeengt.

Methylaminbestimmung.

(Kaninchen I.).

Versuch 1.

50 ccm des konzentrierten Harns, entsprechend der Tagesmenge, wurden nach Folin durchlüftet. Es wurden erhalten 0,353 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Tagesmenge.

20,503 mg dieses Gemenges lieferten 5,243 mg AgJ; folglich 12,450 mg CH_3NH_2 für die Tagesmenge.

Versuch 2.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet; 0,193 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ für die Tagesmenge.

20,560 mg dieses Gemenges lieferten 5,770 mg AgJ; folglich 6,885 mg CH_3NH_2 für die Tagesmenge.

(Kaninchen II.).

Versuch 1.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet; es wurden 0,441 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ für die Tagesmenge erhalten.

21,532 mg dieses Gemenges gaben 3,190 mg AgJ; folglich 9,210 mg CH_3NH_2 für die Tagesmenge.

Versuch 2.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet. 0,395 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ für die Tagesmenge.

21,880 mg dieses Gemenges gaben 4,952 mg AgJ; folglich 13,030 mg CH_3NH_2 für die Tagesmenge.

b) Der nach Lezithininjektion in verschiedenen Stunden entleerte Harn wurde auf 100 ccm eingeeengt.

Methylaminbestimmung.

(Kaninchen I.).

Versuch 1.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet. 0,184 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der ersten Tagesmenge.

20,950 mg dieses Gemenges gaben 3,140 mg AgJ; folglich 3,880 mg CH_3NH_2 für die erste 24-Stundenmenge.

Versuch 2.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet. 0,122 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der zweiten Tagesmenge.

19,250 mg dieses Gemenges gaben 7,140 mg AgJ; folglich 6,950 mg CH_3NH_2 für die zweite Tagesmenge.

Versuch 3.

50 ccm des konzentrierten Harns durchlüftet. 0,395 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der dritten Tagesmenge.

19,420 mg dieses Gemenges gaben 1,406 mg AgJ; folglich 3,699 mg CH_3NH_2 für die dritte 24-Stundenmenge.

(Kaninchen II.).

Versuch 1.

50 ccm vom konzentrierten Harn durchlüftet. 0,412 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der ersten 24-Stundenmenge.

23,555 mg dieses Gemenges gaben 4,932 mg AgJ; folglich 13,030 mg CH_3NH_2 für die erste Tagesmenge.

Versuch 2.

50 ccm vom konzentrierten Harn durchlüftet. 0,342 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der zweiten 24-Stundenmenge.

23,285 mg dieses Gemenges gaben 5,650 mg AgJ; folglich 11,70 mg CH_3NH_2 in der zweiten Tagesmenge.

Versuch 3.

50 ccm vom konzentrierten Harn durchlüftet. 0,110 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der dritten 24-Stundenmenge.

20,690 mg dieses Gemenges gaben 5,634 mg AgJ; folglich 2,690 mg CH_3NH_2 für die dritte Tagesmenge.

Versuch 4.

50 ccm vom konzentrierten Harn durchlüftet. 0,138 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der vierten Tagesmenge.

15,772 mg dieses Gemenges gaben 2,665 mg AgJ; folglich 2,932 mg CH_3NH_2 für den vierten 24-Stundenharn.

Die obigen Resultate werden in folgender Tabelle zusammengefasst. (Tabelle I.).

TABELLE I.

Kaninchen Nr.	Versuchs- Nr.	Methylamin mg (Tagesmenge)		Nach d. Injektion (Stunden)
		Normalharn	Lezithinharn	
I	1	3.460	12.140	48
	2	3.480	6.880	"
	3	2.900	—	"
II	1	4.990	9.210	"
	2	2.830	9.090	"
	3	0.730	—	"
I	1	—	3.880	0-24
	2	—	6.960	24-48
	3	—	3.690	48-72
II	1	—	11.770	0-24
	2	—	13.030	24-48
	3	—	3.960	48-72
	4	—	2.930	72-96

Aus der Zusammenfassung der obigen Resultate geht hervor, dass bei der Lezithininjektion die Methylaminausscheidung des

Harns an Menge auffallend vermehrt wird, und zwar im ersten und zweiten Tagesharn nach der Injektion.

B. GEWEBEVERSUCHE.

Wie oben erwähnt, ergibt die Lezithininjektion eine Methylaminvermehrung des Harns. Deshalb habe ich weiter Versuche vorgenommen, um zu erfahren, wie sich bei mit Lezithin injizierten Kaninchen der Methylamingehalt der einzelnen Gewebe vermehrt. Die Lezithininjektion wurde auf dieselbe Weise wie die oben beschriebene ausgeführt.

Analytische Belege.

Methylaminbestimmung.

I. Normalleber.

1). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,033 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (102 g) erhalten.

15,285 mg dieses Gemenges gaben 2,735 mg AgJ, folglich 0,76 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

2). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,710 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (91 g) erhalten.

22,020 mg dieses Gemenges gaben 0,170 mg AgJ, folglich 0,722 mg: 0,790 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

II. Lezithinleber.

1). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,026 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (90 g).

18,700 mg dieses Gemenges gaben 4,560 mg AgJ, folglich 0,835 mg: 0,82 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

2). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,040 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (85 g).

24,500 mg dieses Gemenges gaben 4,300 mg AgJ, folglich 0,886 mg: 1,42 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

3). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,056 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (100 g).

18,605 mg dieses Gemenges gaben 4,800 mg AgJ, folglich 1,960 mg: 1,96 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

I. Normalmilz.

- 1) 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,020 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtmilz (2 g).
 6,970 mg dieses Gemenges lieferten 0,137 mg AgJ, folglich 0,062 mg: 3,10 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.
- 2). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet 0,025 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtmilz (3.3 g).
 5,965 mg dieses Gemenges gaben 0,200 mg AgJ, folglich 0,113 mg: 3,500mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.

II. Lezithinmilz.

- 1). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,025 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtmilz (3.8 g).
 15,000 mg dieses Gemenges gaben 1,370 mg AgJ, folglich 2,910 mg: 7,600 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.
- 2). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,015 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtmilz (3.7 g).
 6,770 mg dieses Gemenges lieferten 3,90 mg AgJ, folglich 0,279 mg: 7,5 mg% für die Gesamtmilz.

I. Normalniere.

- 1). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,042 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtniere (14 g) erhalten.
 15,600 mg dieses Gemenges gaben 0,550 mg AgJ, folglich 0,195 mg: 1,300 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.
- 2). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,054 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtniere (15 g) erhalten.
 16,500 mg dieses Gemenges gaben 0,536 mg AgJ, folglich 0,23 mg: 1,40 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.

II. Lezithinniere.

- 1). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,012 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtniere (11 g).
 6,960 mg dieses Gemenges gaben 0,850 mg AgJ, folglich 0,23 mg: 1,4mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.
- 2). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,370 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtniere (18 g).
 18,245 mg dieses Gemenges gaben 0,600 mg AgJ, folglich 0,231 mg: 1,3mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.

Die obigen Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst. (Tabelle II).

TABELLE II.

Organ	Kaninchen	Versuchs Nr.	Methylamin	
			mg %	Mittelwert
Leber	Normal	1	0.750	0.770
		2	0.790	
	Lezithin inj.	1	0.820	1.400
		2	1.420	
		3	1.960	
Milz	Normal	1	3.100	3.500
		2	3.900	
	Lezithin inj.	1	7.600	6.900
		2	7.500	
		3	5.600	
Niere	Normal	1	1.300	1.350
		2	1.450	
	Lezithin inj.	1	1.700	0.810
		2	0.700	

Diese Resultate zeigen zusammengefasst, dass bei den mit Lezithin injizierten Kaninchen das Methylamin in der Leber und Milz an Menge vermehrt, aber in der Niere fast nicht verändert wird.

ORGANBREIVERSUCHE I.

Die obigen Versuchsergebnisse zeigen zusammengefasst, dass nach der Injektion von Lezithin der Methylamingehalt in Leber und Milz deutlich vermehrt sind. Man kann annehmen, dass diese Methylaminvermehrung zu der Spaltung des Cholins in inniger Beziehung steht. Das hat mich veranlasst folgende Versuche anzustellen, um den sicheren Beweis dafür zu geben.

Ich habe zuerst die Organgewebe zu Brei zerquetscht und

in 2 gleiche Mengen geteilt.

Versuch I: Zum ersten Teil des Organbreis wurde das 5fache Volum einer Pufferlösung zugesetzt, welche aus Phosphat dargestellt war, und PH 6,5 zeigte.

Versuch II: Zum zweiten Teil des Organbreis wurde 0,5 g Cholinchlorid hinzugesetzt.

Bei jedem Versuch liess ich das Material unter Zusatz von Toluol bei 37° 24 Stunden lang stehen, worauf die Analyse erfolgte.

Analytische Belege.

I. Normalleber.

1). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,033 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (102 g) erhalten.

15,285 mg dieses Gemenges gaben 2,735 mg AgJ, folglich 0,76 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

2). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,710 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (91 g) erhalten.

22,020 mg dieses Gemenges gaben 0,170 mg AgJ, folglich 0,722 mg: 0,790 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

II. Leber + Cholinchlorid.

1). 50 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet, es wurden 0,038 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ erhalten, d. h. 0,077 g für die Gesamtleber (100 g).

22,440 mg des Gemenges von Salmiak und Methyaminchlorhydrat lieferten 0,875 mg AgJ, folglich 0,403 mg: 0,405 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

2). 50 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet, es wurden 0,178 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ erhalten, d. h. 0,356 g für die Gesamtleber (117 g).

22,915 mg dieses Gemenges gaben 0,825 mg AgJ, folglich 2,280 mg: 1,800 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

3). 50 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet, es wurden 0,014 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ erhalten, d. h. 0,284 g für die Gesamtleber (112 g).

19,980 mg dieses Gemenges gaben 1,005 mg AgJ, folglich 1,790 mg: 1,5 mg% für die Gesamtleber.

I. Normalmilz.

1). 100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,010 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtmilz (2 g).

6,970 mg dieses Gemenges gaben 1,575 mg AgJ, folglich 0,310 mg: 5,000 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.

2). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,045 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtmilz (3.3 g).

5,965 mg dieses Gemenges gaben 1,115 mg AgJ, folglich 0,189 mg: 5,7 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.

II. Milz + Cholinchlorid.

1). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,010 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtmilz (3 g).

12,620 mg dieses Gemenges lieferten 1,700 mg AgJ, folglich 0,162 mg: 5,4 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.

2). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,025 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtmilz (2.9 g).

13,890 mg dieses Gemenges gaben 1,370 mg AgJ, folglich 0,347 mg: 11,000 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.

3). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,014 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtmilz (3.2 g).

14,500 mg dieses Gemenges gaben 1,530 mg AgJ, folglich 0,187 mg: 5,8 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtmilz.

I. Normalniere.

1). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,046 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtniere (14 g).

15,755 mg dieses Gemenges gaben 0,670 mg AgJ, folglich 0,252 mg: 1,6 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.

2). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,065 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtniere (15 g).

16,365 mg dieses Gemenges gaben 0,655 mg AgJ, folglich 0,349 mg: 2,1 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.

II. Niere + Cholinchlorid.

1). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,012 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtniere.

8,780 mg dieses Gemenges gaben 0,425 mg AgJ, folglich 0,082 mg: 0,33 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere (15 g).

2). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,042 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtniere (17 g).

18,245 mg dieses Gemenges gaben 0,755 mg AgJ, folglich 0,23 mg: 1,3 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.

3). 100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,030 g NH_4Cl in der Gesamtniere (19 g).

19,775 mg dieses Gemenges gaben 0,665 mg AgJ, folglich 0,138 mg: 0,7 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtniere.

Die obigen Resultate sind in folgender Tabelle zusammengefasst. (Tabelle III).

TABELLE III.

Organ	Versuchs Nr.	Methylamin	
		mg %	Mittelwert
Leber	1	0.750	0.770
	2	0.790	
Leber + Cholin	1	0.400	1.230
	2	1.800	
	3	1.500	
Milz	1	5.000	5.350
	2	5.700	
Milz + Cholin	1	5.400	6.900
	2	11.000	
	3	5.800	
Niere	1	1.600	1.850
	2	2.100	
Niere + Cholin	1	0.440	0.810
	2	1.300	
	3	1.700	

Aus obigen Ergebnissen ist es klar, dass die Methylaminbildung im Gewebsbrei beim Zusatz von Cholin sich auffallend vermehrt, d. h. die Methylaminbildung durch die Spaltung des Cholins herbeigeführt wird.

ORGANBREIVERSUCHE II.

Wie oben erwähnt, habe ich bewiesen, dass die Methylamin-

bildung durch die Spaltung des Cholins entsteht. Um den Mechanismus dieser Spaltung festzustellen, und weiter um zu wissen, bei welchem PH sich die Methylaminbildung aus Cholin am stärksten zeigt, habe ich ferner folgende Versuche vorgenommen:

Ich habe drei Versuchsreihen angelegt. Versuch I und II wurden auf dieselbe Weise ausgeführt wie die im letzten Versuche beschriebenen, nur dass die Pufferlösung verschiedenes PH zeigte. Bei Versuch III wurde der bei 60° 30 Minuten lang erhitzte Organbrei verwendet, und im übrigen auf dieselbe Weise verfahren, wie im Versuch II.

Analytische Belege.

Versuch 1.

Normalleber (PH 4,5).

100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,200 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtleber (98 g) erhalten.

25,535 mg dieses Gemenges gaben 0,320 mg AgJ, folglich 0,337 mg: 0,34 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (PH 4,5)

(nicht erhitzt).

100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,139 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtleber (98 g) erhalten.

19,115 mg dieses Gemenges gaben 0,770 mg AgJ, folglich 0,721 mg: 0,73 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (PH 4,5)

(erhitzt).

100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,100 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtleber (98 g) erhalten.

19,950 mg dieses Gemenges gaben 0,625 mg AgJ, folglich 0,425 mg: 0,43 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Versuch 2.

Normalleber (PH 5,5).

100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,025 g $\begin{Bmatrix} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{Bmatrix}$ in der Gesamtleber (70 g) erhalten.

16,900 mg dieses Gemenges gaben 0,15 mg AgJ, folglich 0,031 mg: 0,044 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (P_H 5,5)

(nicht erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,071 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (70 g).

27,990 mg dieses Gemenges lieferten 0,150 mg AgJ, folglich 1,380 mg:
1,9 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (P_H 5,5)

(erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,050 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (70 g) erhalten.

24,406 mg dieses Gemenges gaben 0,147 mg AgJ, folglich 0,044 mg:
0,067 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Versuch 3.

Normalleber (P_H 6,5).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,075 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (82 g).

20,590 mg dieses Gemenges gaben 1,370 mg AgJ, folglich 0,675 mg:
0,820 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (P_H 6,5)

(nicht erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,081 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (82 g) erhalten.

22,805 mg dieses Gemenges geben 2,225 mg AgJ, folglich 1,088 mg:
1,310 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (P_H 6,5)

(erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,056 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (82 g) erhalten.

19,605 mg dieses Gemenges gaben 0,990 mg AgJ, folglich 0,384 mg:
0,470 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Versuch 4.

Normalleber (P_H 7,5).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,040 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (78 g).

27,882 mg dieses Gemenges gaben 0,860 mg AgJ, folglich 0,215 mg:
0,275 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (PH 7,5)
(nicht erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,053 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (78 g).

15,915 mg dieses Gemenges gaben 3,485 mg AgJ, folglich 0,151 mg:
1,9 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (PH 7,5)
(erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,036 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (78 g).

16,770 mg dieses Gemenges gaben 0,400 mg AgJ, folglich 0,162 mg:
0,207 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Versuch 5.

Normalleber (PH 8,5).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; 0,043 g $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$
in der Gesamtleber (65 g).

14,060 mg dieses Gemenges gaben 1,320 mg AgJ, folglich 0,516 mg:
0,79 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (PH 8,5)
(nicht erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; es wurden 0,074 g
 $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der Gesamtleber (65 g) erhalten.

24,740 mg dieses Gemenges gaben 5,895 mg AgJ, folglich 2,350 mg:
3,700 mg% CH_3NH_2 für die Gesamtleber.

Leber + Cholinchlorid (PH 8,5)
(erhitzt).

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; es wurden 0,040 g
 $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der Gesamtleber (65 g) erhalten.

16,295 mg dieses Gemenges, 0,895 mg AgJ. Die Gesamtleber enthält
0,291 mg; 0,450 mg% CH_3NH_2 .

Versuch 6.

Normalleber (PH 9,5)

100 ccm der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; es wurden 0,028 g
 $\left\{ \begin{array}{l} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{array} \right.$ in der Gesamtleber (58,3 g) erhalten.

14,690 mg dieses Gemenges; 0,495 mg AgJ. Die Gesamtleber enthält
0,125 mg; 0,440 mg% CH_3NH_2 .

Leber + Cholinchlorid (PH 9,5)

(nicht erhitzt)

100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet, es wurden 0,045 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ in der Gesamtleber (58,3 g) erhalten.
 12,975 mg dieses Gemenges gaben 0,480 mg AgJ. Die Gesamtleber enthält 0,194 mg: 0,430 mg% CH_3NH_2 .

Leber + Cholinchlorid (PH 9,5)

(erhitzt)

100 cem der konzentrierten Flüssigkeit durchlüftet; es wurden 0,045 g $\begin{cases} \text{NH}_4\text{Cl} \\ \text{CH}_3\text{NH}_2\text{HCl} \end{cases}$ erhalten, entsprechend in der Gesamtleber (58,3 g).
 12,225 mg dieses Gemenges; 0,300 mg AgJ. Die Gesamtleber enthält 0,140 mg: 0,320 mg% CH_3NH_2 .

Die obigen Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst. (Tabelle IV).

TABELLE IV.

Versuchs Nr.	PH	Methylamin mg %		
		Leber	Leber + Cholinchlorid	
			Erhitzt (60°:30')	Nicht erhitzt
1	4.5	0.340	0.430	0.730
2	5.5	0.040	0.067	1.900
3	6.5	0.823	0.467	1.310
4	7.5	0.275	0.207	1.930
5	8.5	0.790	0.450	3.700
6	9.5	0.440	0.320	0.430

Aus der obigen Tabelle ist zu erkennen, dass sich die Methylaminbildung im Gewebsbrei beim Zusatz von Cholin auffallend vermehrt und beim PH 7-8 am stärksten zeigt. Diese Vermehrung findet sich aber niemals in den mit erhitztem Brei ausgeführten Versuchen, welche Tatsachen wohl darauf zurückzuführen sind, dass die Methylaminbildung durch die enzymatische Spaltung des Cholins zustande kommt. Aus obigen Ergebnissen erhellt die Abspaltung von Methylamin aus dem im Körper vorhandenen Cholin durch Fermentwirkung.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Methyলামিনausscheidung im Harn vermehrt sich auffallend nach der Lezithininjektion, und zwar im ersten und zweiten Tagesharn nach der Injektion.

2. Das Methyলামিন in der Leber und Milz nimmt an Menge zu bei den mit Lezithin injizierten Kaninchen, verändert sich aber in der Niere fast nicht.

3. Die Methyলামিনbildung im Gewebsbrei vermehrt sich auffallend beim Zusatz von Cholin, d. h. die Methyলামিনbildung ist auf die Spaltung des Cholins zurückzuführen.

4. Die Vermehrung der Methyলামিনbildung aus Cholin zeigt sich beim PH 7-8 am stärksten, jedoch niemals bei den mit erhitztem Brei ausgeführten Versuchen.

SCHLUSS.

Aus obigen Ergebnissen kann man schliessen, dass die Methyলামিনbildung im Gewebsbrei durch die enzymatische Spaltung des Cholins zustande kommt, dass also von dem im Tierkörper vorhandenen Cholin durch Fermentwirkung Methyলামিন abgespalten wird.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

Friedrich (1930): Bioch. Z., **221**, 445.

Kapeller-Adler u. Toda (1932): Bioch. Z., **248**, 403.

*BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DES KOHLEN- HYDRATSTOFFWECHSELS.

VON

MAMORU INUTSUKA.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. Naomi Kageura,
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 22. August 1933)

Ikejiri (1933), der unter der Leitung von Prof. Kageura den bekannten Hungerdiabetes an erwachsenen Hunden eingehend experimentell studiert hat, bestätigte, dass durch Hunger die Fähigkeit des Organismus, Kohlenhydrat zu assimilieren, herabgesetzt wird, sodass die alimentäre Blutzuckersteigerung nach Zuckerdarreichung dabei weit höher und länger andauernd in die Erscheinung tritt, als bei Normalernährung. Weiter stellte er fest, dass diese Störung im Kohlenhydratstoffwechsel bei Hunger von etwa über dreiwöchiger Dauer (Hunger von langer Dauer) stärker zum Vorschein kommt als bei solchem von etwa unter einwöchiger Dauer (Hunger von kurzer Dauer); ferner, dass dabei die Herabsetzung der Fähigkeit der Leber, Glykogen zu speichern, welche einen gewissen Parallelismus mit dem Grade der genannten Störung zeigt, für die Beeinträchtigung der Assimilationsfähigkeit für Kohlenhydrat sicher ein ätiologisches Moment darstellt. Wie verhält sich nun überhaupt die Resorptionsgeschwindigkeit des Darmes für Kohlenhydrate zu der abnorm gesteigerten Blutzuckererhöhung, welche bei Hunger bekanntlich stets beobachtet wird?

Durch experimentelle Untersuchung an jungen Kaninchen ist Sakauchi (1932) zum Schluss gekommen, dass im fortgeschrittenen Hungerstadium die alimentäre Glykosurie nach Zuckerzufuhr nicht mehr auftritt, und die hyperglykämische Reaktion nach derselben sehr schwach ausfällt oder sogar gänzlich ausbleibt, während in der vorangehenden Periode des Hungers die genannte

* Die vorliegende Arbeit wurde auf der 30. Tagung (1933) der japanischen Gesellschaft für innere Medizin in Kyoto vorgetragen.

Glykosurie sowie Hyperglykämie häufig nachgewiesen wird, und dass im erstgenannten Stadium nach intravenöser Darreichung von Zucker sich doch die Hyperglykämie deutlich und sehr verlängert nachweisen lässt und immer von Glykosurie begleitet wird. Auf Grund seiner Versuche führt dieser Autor das Ausbleiben der Glykosurie nach peroraler Zuckerdarreichung, das beim späteren Hungerstadium beobachtet wird, auf die verminderte Resorptionsfähigkeit der Gedärme für Zucker zurück.

Haudek und Stigler (1910) stellten aber durch Selbstversuche radiologisch fest, dass die Austreibungszeit des Magens kürzer ist, wenn die Mahlzeit mit Hungergefühl, als wenn sie ohne dieses genossen wird. Auch Carlson (1912/13) fand, dass zwischen Grösse des Hungergefühls und Stärke der Magenkontraktionen ein direktes Verhältnis besteht, und Rogers (1915) sah beim Kaninchen die Kontraktion des Magens im Hunger stärker werden. Maunoir (1912) verfolgte beim Hunde die Kontraktionen des Pylorus und stellte fest, dass diese rhythmisch sind und auch durch 48-stündigen Hungerzustand ihren Rhythmus nicht ändern. Die Ergebnisse sind jedoch nicht übereinstimmend, sodass man sich nicht darauf stützen kann.

Hauptzweck der vorliegenden Arbeit war, die Frage zu erledigen, in welcher Art und Weise die Entleerungszeit des Magens bzw. die Resorptionsgeschwindigkeit im Darm für Kohlenhydrate an der alimentären Blutzuckersteigerung im Hungerzustande beteiligt ist, welche dabei, wie erwähnt, viel ausgesprochener ist, als bei normaler Ernährung.

Matsui (1926) hat gefunden, dass bei Hunden die Resorptionsgeschwindigkeit des Darmes für Zucker mit der Glykogenbildung in der Leber Schritt hält, sodass der peroral eingeführte Zucker in ca. 4 Stunden fast vollständig vom Verdauungstraktus resorbiert wird, und der Glykogengehalt in der Leber ca. 6 Stunden nach der Zuckerdarreichung seinen maximalen Wert erreicht, aber sich schon etwa 12 Stunden nach derselben wieder dem Nüchternwert nähert. Dabei fehlt allerdings eine Untersuchung über das Verhalten des Blutzuckers und des Muskelglykogens.

Bei meiner Untersuchung wurde zuerst 7 Gruppen erwachsener

Hunde (im ganzen 24 Tiere), welche vorher mit gemischter Kost normal gut genährt worden waren, 24 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme 10 g Traubenzucker pro kg Körpergewicht in Form einer 25%igen erwärmten wässrigen Lösung durch Sonde in den Magen eingeführt und die danach eintretende Blutzuckersteigerung halb- oder einstündlich nach Hagedorn-Jensen untersucht. Man war dabei bestrebt, bei dieser sowie den folgenden Untersuchungen Tiere von annähernd gleichem Körpergewicht zu benutzen, doch liessen sich gewisse Unterschiede desselben nicht immer vermeiden. Hierauf wurden die Tiere je nach der Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten, und zwar entweder vor der Zuckerbelastung oder 1, 2, 4, 6, 12 und 24 Stunden nach derselben mit Luftembolie getötet, und der Gehalt sowohl des Magen- als auch des Darminhaltes an reduzierenden Substanzen, welche hierbei im praktischen Sinne als Zucker betrachtet wurden, nach Otto (1901) bestimmt. Gleichzeitig wurde der Gehalt der Leber und des Muskels an Glykogen mit der Mori-Iwasakischen Methode untersucht, bei welcher aber das oben erwähnte Verfahren von Hagedorn-Jensen mitbenutzt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle I und Abbildung I übersichtlich dargestellt.

Die Blutzuckersteigerung erreicht ihr Maximum in der Regel $\frac{1}{2}$ –1 Stunde nach der Zuckerdarreichung und sinkt nach 4 Stunden wieder bis zum nüchternen Niveau, das vor der Zuckerzufuhr, d. h. 24 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme, ermittelt wird. Die Höhe des Blutzuckers wird ferner nach 6 Stunden ein wenig niedriger gefunden als der Anfangswert und steigt nach 12 Stunden wieder bis zu dem obengenannten Wert vor der Zuckerzufuhr auf, um endlich nach 24 Stunden ihr Minimum zu erreichen. Im Wert, der 6 Stunden nach der Zuckerbelastung gefunden wird, kann eine nach Hyperglykämie eintretende hypoglykämische Phase erkannt werden. Der Gehalt der Leber an Glykogen zeigt nach 6 Stunden seinen maximalen Wert, was mit der Angabe Matsui's übereinstimmt, und nach 24 Stunden seinen minimalen Wert, welcher viel geringer ist als der Wert vor der Zuckerzufuhr. Beim Muskelglykogen ist aber keine nennenswerte Schwankung seines Gehaltes innerhalb der Beobachtungszeit

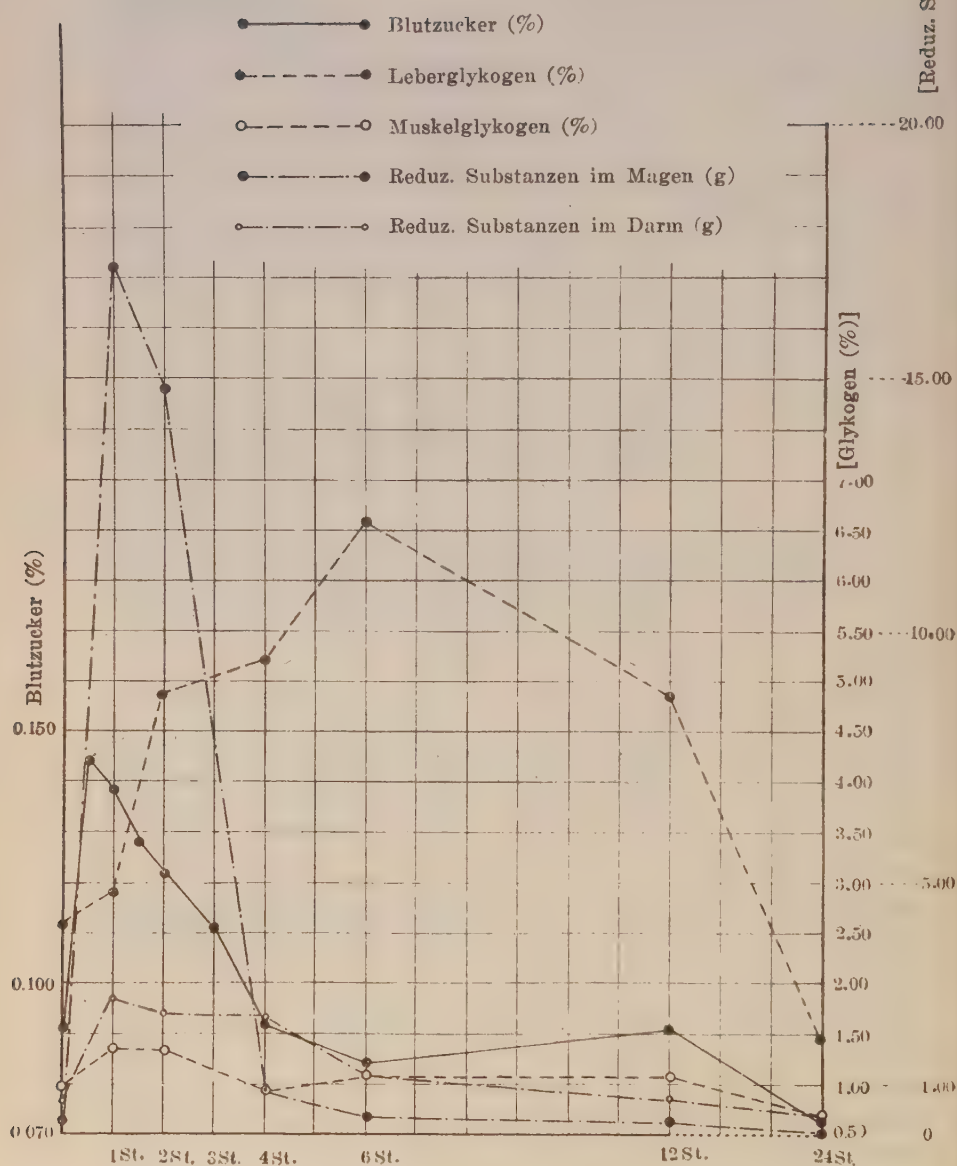
TABELLE

Nr. u. Geschl. d. Hunde	Körper- gewicht (kg)	Vor der Zucker- zufuhr	Blutzuckergehalt (%)						
			Nach der Zuckerzufuhr						
			1/2 St.	1 St.	1 1/2 St.	2 St.	3 St.	4 St.	6 St.
1. ♂	5,7	0,093							
2. ♂	6,25	0,102							
3. ♂	5,35	0,093							
4. ♀	6,65	0,075	0,159	0,134					
5. ♂	5,2	0,083	0,136	0,124					
6. ♀	4,1	0,102	0,216	0,262					
7. ♀	5,7	0,079	0,118	0,090	0,116	0,116			
8. ♂	5,4	0,090	0,108	0,103	0,099	0,099			
9. ♂	5,3	0,098	0,138	0,134	0,148	0,141			
10. ♂	5,2	0,095	0,162	0,147	0,124	0,124			
11. ♂	6,5	0,109	0,226	0,188	0,191	0,183	0,152	0,117	
12. ♂	6,9	0,090	0,161	0,141	0,150	0,129	0,119	0,090	
13. ♂	6,7	0,086	0,119	0,119	0,093	0,086	0,079	0,084	
14. ♀	5,25	0,086	0,129	0,117	0,119	0,109	0,101	0,088	
15. ♂	4,25	0,095	0,117	0,116	0,119	0,116	0,111	0,117	
16. ♀	6,5	0,093	0,127	0,134	0,120	0,120	0,117	0,077	0,088
17. ♂	5,25	0,095	0,147	0,134	0,129	0,127	0,110	0,097	0,090
18. ♂	4,9	0,099	0,131	0,124	0,128	0,122	0,133	0,077	0,099
19. ♂	4,0	0,097	0,113	0,134	0,133	0,128	0,127	0,118	0,082
20. ♀	3,9	0,073	0,179	0,181	0,139	0,100	0,075	0,065	0,055
21. ♂	8,45	0,086	0,106	0,112	0,095	0,099	0,081	0,074	0,074
22. ♂	6,5	0,088	0,119	0,111	0,114	0,115	0,102	0,101	0,082
23. ♀	4,7	0,088	0,163	0,135	0,137	0,132	0,091	0,094	0,090
24. ♂	6,5	0,091	0,150	0,152	0,153	0,147	0,162	0,092	0,092
Im Mittel	5,63	0,091	0,144	0,138	0,128	0,122	0,111	0,092	0,084

I.

		Leber					Muskel- glyko- gen (%)	Reduzierende Substanzen	
		Gewicht	Glykogen			im Magen		im Darm	
12 St.	24 St.		%	Gesamte Menge(g)	Menge(g) pro kg				
			199,2 230,0 188,5	3,18 3,53 1,06	6,34 8,12 2,00	1,11 1,28 0,37	0,87 1,17 0,94	0,28 0,40 0,17	0,88 0,52 0,81
		Mittel- wert		2,59			0,99	0,28	0,74
			225,0 249,0 132,0	2,92 3,38 2,49	6,58 8,40 3,28	1,00 1,62 0,80	1,15 0,99 1,91	20,50 15,15 15,87	2,22 2,60 3,17
		"		2,93			1,35	17,17	2,66
			222,0 222,0 190,0 164,7	7,32 2,80 6,65 2,61	16,25 6,22 12,63 4,30	2,86 1,15 2,38 0,83	2,19 1,31 0,87 0,97	9,42 19,27 14,05 16,39	2,38 1,10 4,11 2,02
		"		4,85			1,34	14,78	2,40
			155,1 258,0 161,0 202,3 200,0	5,48 5,22 4,85 5,25 5,22	8,50 13,46 7,81 10,63 10,44	1,46 2,07 1,17 2,02 2,46	1,10 0,78 0,85 0,90 0,97	0,31 0,43 0,45 0,56 1,56	1,45 4,10 0,85 1,85 3,17
		"		5,20			0,92	0,86	2,28
			305,0 176,0 210,5 180,0 211,0	5,31 9,47 6,40 7,25 4,35	16,19 16,66 13,48 13,05 9,18	2,49 3,17 2,75 3,26 2,35	1,22 1,04 0,83 1,12 1,24	0,42 0,36 0,41 0,11 0,56	1,43 0,78 0,83 0,50 2,50
		"		6,56			1,09	0,37	1,21
0,088 0,085			485,0 168,6	6,86 2,82	33,25 5,21	3,94 0,80	0,94 1,22	0,35 0,16	0,91 0,43
		"		4,84			1,08	0,26	0,67
0,085 0,105	0,084 0,056		120,5 248,0	1,09 1,81	1,31 4,49	0,30 0,72	0,80 0,53	0,06 0,07	0,21 0,40
		"		1,45			0,67	0,07	0,31
0,91	0,073								

Abbildung I.



nachzuweisen. Der Gehalt des Mageninhaltes an reduzierenden Substanzen ist 1–2 Stunden nach der Zuckerbelastung maximal, 4 Stunden nach derselben schon sehr deutlich vermindert, sodass er hier nur in unbedeutendem Masse den Nüchternwert zu übertreffen scheint, und kehrt innerhalb 6–12 Stunden nach der Darreichung des Zuckers zum Anfangswert zurück. Die Entleerungszeit des Magens kann somit unter obigen Versuchsbedingungen praktisch als gleich 4 Stunden betrachtet werden. Der Gehalt des Darminhaltes an reduz. Subst. wird im allgemeinen so klein gefunden, dass unter den verschiedenen Bedingungen kein deutlicher Unterschied desselben nachzuweisen ist, doch ist eine geringfügige Zunahme desselben nach 1–2–4 Stunden nicht zu verkennen. Hierbei ist zu bemerken, dass der Magen ca. 4 Stunden nach der Zuckerzufuhr leer ist, im Moment wo der Blutzuckergehalt schon bis zum Ausgangswert zurückfällt, und dass die Glykogenspeicherung in der Leber nach ca. 6 Stunden maximal ist, in welchem Zeitpunkte beim Blutzucker sich gerade eine posthyperglykämische Hypoglykämie nachweisen lässt. Siehe Abbildung I!

Im zweiten Versuch wurden 4 Hunde 4 Stunden nach der Zuckerverabreichung, bei welcher ihnen ausser der genannten Menge Traubenzucker 50 g Schweineschmalz dargereicht worden war, getötet, und dann wurden genau dieselben Untersuchungen, wie vorher, ausgeführt. Die Resultate sind aus Tabelle II (A) zu ersehen.

Aus dieser Tabelle ergibt sich, dass der Zusatz von Fett allein keinen nennenswerten Einfluss weder auf die Entleerungszeit des Magens für Zucker, — wenn auch im Gehalt des Mageninhaltes an reduz. Subst. eine minimale Zunahme der letzteren nicht zu verkennen ist, — noch auf den Blutzuckerwert ausübt, — wenn gleich die Form der Blutzuckerkurve einen etwas abweichenden Typus aufweist, falls man die Resultate mit denen beim vorangehenden Versuch vergleicht. Siehe auch Abbildung II! Dazu ist zu bemerken, dass das Fett selbst dabei makroskopisch noch reichlich im Magen vorhanden ist. Der Gehalt der Leber sowie des Muskels an Glykogen und der des Darminhaltes an reduz. Subst. bleibt dabei im grossen Ganzen unverändert.

TABELLE

Nr. u. Geschlecht d. Hundes	Körper- gewicht (kg)	Blutzucker (%)					
		vor der Zucker- zufuhr	nach der Zuckerzufuhr				
			1/2 St.	1 St.	1 1/2 St.	2 St.	3 St.
25. ♀	4,7	0,092	0,152	0,137	0,137	0,142	0,122
A) 26. ♀	3,8	0,084	0,138	0,117	0,106	0,110	0,104
27. ♀	6,7	0,088	0,111	0,113	0,115	0,118	0,118
28. ♀	4,3	0,084	0,145	0,106	0,145	0,139	0,122
Mittelwert	4,87	0,087	0,137	0,118	0,126	0,127	0,117
29. ♀	5,3	0,088	0,126	0,110	0,117	0,102	0,088
30. ♀	3,15	0,088	0,132	0,119	0,124	0,117	0,106
(B) 31. ♂	3,6	0,081	0,093	0,081	0,087	0,080	0,072
32. ♀	4,6	0,086	0,146	0,122	0,125	0,124	0,074
Mittelwert	4,16	0,086	0,124	0,108	0,113	0,106	0,085

TABELLE

Nr. u. Geschl. d. Hundes	Körpergewicht			Blutzucker (%)				
	am Anfang	am Ende einer Woche.	Verlust (%)	vor der Zucker- zufuhr	nach der Zuckerzufuhr			
					1/2 St.	1 St.	1 St.	2 St.
33. ♂	5,75	4,6	20	0,101	0,163	0,200	0,229	0,231
34. ♂	5,1	4,05	21	0,093	0,200	0,287	0,312	0,281
35. ♂	5,0	4,05	19	0,087	0,142	0,187	0,217	0,228
36. ♀	3,85	3,4	12	0,084	0,208	0,287	0,260	0,202
37. ♂	4,5	3,35	26	0,083	0,170	0,188	0,188	0,193
Im Mittel	4,84	3,89	20	0,090	0,177	0,230	0,241	0,227

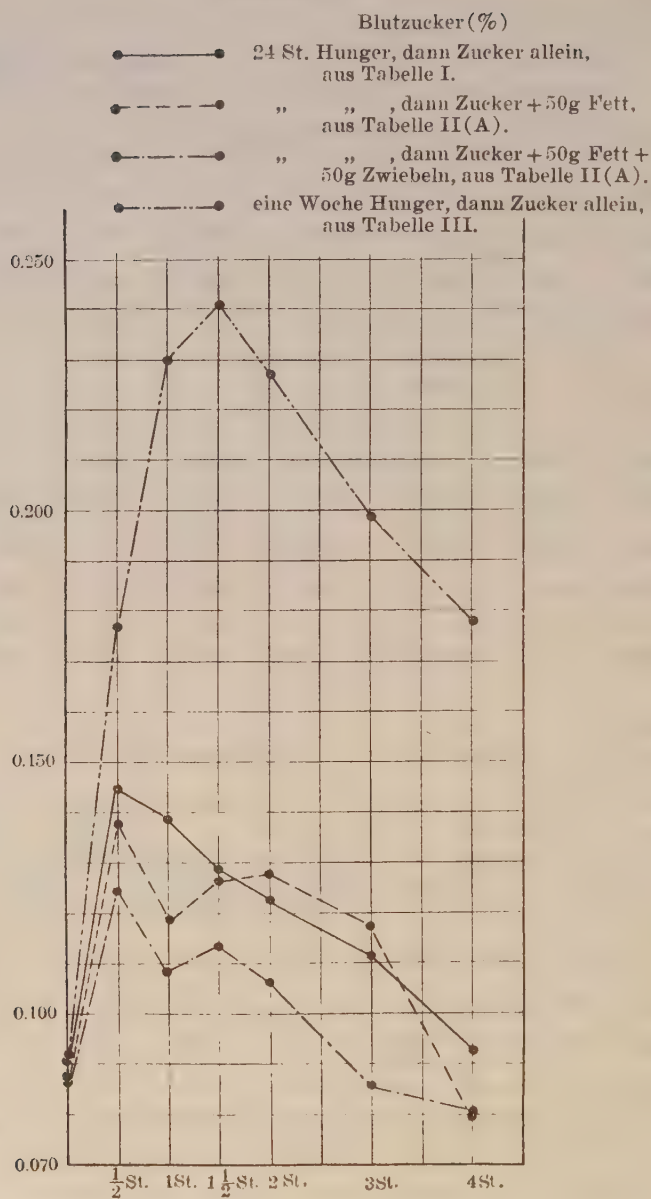
II.

4 St.	Leber				Muskel- glykogen (%)	Reduzierende Substanzen	
	Gewicht	Glykogen		Menge (g) pro kg		im Magen	im Darm
		%	gesamte Menge (%)				
0,084	214,5	4,24	9,10	1,94	0,75	1,67	1,79
0,097	169,0	5,53	9,34	2,46	0,80	2,84	2,32
0,070	270,0	6,21	16,78	2,50	1,03	1,14	1,61
0,066	168,5	3,79	6,39	1,48	0,82	0,95	2,08
0,079		4,94			0,85	1,65	1,95
0,070	252,0	5,05	12,72	2,40	1,17	5,33	2,58
0,097	126,7	3,58	5,54	1,76	0,68	5,97	2,22
0,061	160,6	6,16	9,89	2,75	1,15	4,60	1,64
0,092	183,3	2,99	5,49	1,19	0,71	2,48	2,24
0,080		4,45			0,93	4,60	2,17

III.

		Leber				Muskel- glykogen (%)	Reduzierende Substanzen	
		Gewicht	Glykogen				im Magen	im Darm
3 St.	4 St.		%	gesamte Menge (g)	Menge (g) pro kg			
0,223	0,212	172,0	4,66	8,02	1,74	0,82	5,95	3,00
0,279	0,199	123,8	1,93	2,39	0,60	0,61	10,87	2,00
0,182	0,173	156,6	5,39	8,34	2,06	0,87	6,17	2,90
0,145	0,150	126,0	2,68	3,38	0,99	0,94	3,19	1,98
0,168	0,155	105,0	1,97	2,06	0,62	0,80	7,79	1,61
0,199	0,178		3,33			0,81	6,79	2,30

Abbildung II.



Um die Entleerungszeit des Magens deutlich verlängern zu können, wurden im dritten Versuch 4 Hunden ausser der genannten Menge Zucker und Fett noch 50 g gebratene Zwiebeln hinzugegeben, und weiter genau dieselben Untersuchungen angestellt.

Aus Tabelle II (B) kann man leicht ersehen, dass in diesen Fällen die Entleerungszeit des Magens für Zucker beträchtlich verlängert und Hand in Hand damit der Grad und die Dauer der Blutzuckererhöhung bedeutend herabgedrückt wird. Der Glykogenansatz der Leber und der Muskeln sowie der Gehalt des Darminhaltes an reduz. Subst. wird dadurch nicht merkbar beeinflusst. Man könnte aber dagegen einwenden, dass dabei der Gehalt der Zwiebeln an Kohlenhydrat nicht berücksichtigt worden ist. Nach meinen diesbezüglichen Untersuchungen enthalten aber 50 g bei uns einheimischer Zwiebeln 2,1 g reduz. Subst., von denen 1,96 g oder rund 2 g, d. i. über 90%, schon in kurzer Zeit im Hundemagen herausgelaugt werden. In der vorangehenden Untersuchung wurde z. B. beim Hunde Nr. 25 (Körpergewicht 4,7 kg) von der Anfangsmenge: 47 g Zucker, nach 4 Stunden nur 1,67 ($47 \times 1/28$) g im Magen wieder gefunden. Folglich muss dieses Tier ca. 2 g Zucker als Plus-Menge, d. h. 49 g im ganzen bekommen haben und es müssen dann $ca. 49 \times 1/28 = 1,75$ g Zucker nach derselben Zeit als Restzucker gefunden werden, wenn dem Tiere 50 g Zwiebeln hinzugegeben worden sind. Dieser Überbetrag des 4-Stundenrestes, $1,75 - 1,67 = 0,08$ g ist so verschwindend klein, dass von einer bedeutenden Beteiligung der aus Zwiebeln extrahierten Kohlenhydrate am Gehalt der reduz. Subst., welche nach 4 Stunden im Magen gefunden wurden, keine Rede sein kann.

Beim vierten Versuch wurden an 5 Hunden, welche vorher eine Wochelang gefastet hatten, wieder dieselben Untersuchungen ausgeführt, nachdem ihnen die gleiche, aber auf das durchs Hungern reduzierte Körpergewicht bezogene Menge Zucker verabreicht worden war.

Wie Tabelle III zeigt, ist bei Hunger die alimentäre Blutzuckersteigerung viel ausgesprochener, hinsichtlich sowohl der Höhe als auch der Dauer, als im normalen Zustande, was vor allem

der Angabe Ikejiris entspricht, während die Entleerungszeit des Magens für Zucker bei Hunger deutlich verlängert ist. Die Resorptionsgeschwindigkeit des Darmes bleibt unter diesen Bedingungen im grossen Ganzen unverändert. Die Glykogenstapelung der Leber zeigt dabei eine nicht unbeträchtliche Abnahme, aber die der Muskeln nicht.

Aus der Zusammenfassung aller obenerwähnten Versuchsergebnisse geht hervor, dass bei Hunger die alimentäre Blutzuckersteigerung hinsichtlich der Höhe sowie der Dauer viel stärker ist, und dass ihr Kurvengipfel auffallend später auftritt als im Normalzustande; ferner dass die Entleerungszeit des Magens für Zucker dabei bedeutend verlängert ist. Während im stoffwechselnormalen Zustande die Blutzuckersteigerung nach der Zuckerdarreichung parallel zu der Verzögerung der Entleerung des Mageninhaltes vermindert wird, ist das im Hunger nicht der Fall, sodass hier an der sehr gesteigerten Hyperglykämie die Verlangsamung der Entleerung des Mageninhaltes in keiner Weise beteiligt zu sein scheint. Diese Erscheinung beruht wahrscheinlich darauf, dass die Hyperglykämie nach peroraler Zuckerzufuhr, die m. E. wesentlich durch die Störung im intermediären Kohlenhydratstoffwechsel in die Höhe getrieben wird, zu stark ist, als dass sie durch die Verlängerung der Entleerungszeit des Magens herabgedrückt werden könnte. Vergl. Abbildung II!

Der langsamere Verlauf der Blutzuckerkurve und das Verhalten der reduz. Subst. im Verdauungstraktus bei Hunger kann mit Recht gegen die Annahme einer beschleunigten Filtration, Diffusion oder Osmose durch die Darmepithelien oder einer Änderung der unbekannten vitalen Prozesse, die zu beschleunigter Resorption durch die Darmschleimhaut führen könnten, angeführt werden. Jedenfalls kann man keinen Anhaltspunkt dafür finden, dass die bei Hunger deutlich gesteigerte Hyperglykämie etwa auf der beschleunigten Entleerung des Mageninhaltes bzw. der dadurch gesteigerten Resorptionsgeschwindigkeit im Darm für Kohlenhydrate oder der durch Hunger herbeigeführten Änderung der Fähigkeit der Darmschleimhaut an sich, Zucker zu resorbieren, beruhen könnte, was sowohl mit den klinischen Erfahrungen

Hoppe-Seylers als auch mit den von Hofmeister an Hunden und von Staub an Menschen beobachteten Tatsachen im Einklang steht. Die, wie oben erwähnt, bei meiner Untersuchung beobachteten Erscheinungen finden in den Erfahrungen am Krankenbett eine Analogie, welche vor allem von Sakaguchi hervorgehoben wird, und die so lautet: Beim leichten Diabetes pflegt sich, falls bei der Nahrung der Gehalt an Kohlenhydraten seine Toleranz nicht sehr übertrifft, die Glykosurie zu vermindern, wenn dabei durch Fett oder Atropingabe die Entleerungszeit des Magens verlängert wird, während beim schweren Diabetes, falls eine seine Toleranz beträchtlich übertreffende Menge Kohlenhydrat dargereicht wird, die genannte Massregel keinen ausgesprochenen Erfolg aufweist. Zum Schluss dieses Aufsatzes hebe ich besonders hervor, dass meiner Überzeugung nach die bei Hunger beobachtete abnorm gesteigerte Hyperglykämie nach peroraler Zuckerzufuhr wesentlich auf die Störung im intermediären Kohlenhydratstoffwechsel zurückzuführen ist.

Zuletzt komme ich der angenehmen Pflicht nach, Herrn Dr. Keizo Yoshio, Assistent an unserer Klinik, für seine weitgehende Unterstützung bei diesen Versuchen meinen herzlichsten Dank abzustatten.

LITERATUR.

- Carlson, A. J. (1912/13): *Americ. Journ. Physiol.*, **31**, 151.
 Derselbe (1933): II. Mitteil., (deutsch), *Ebenda*, **11**, No. 10. (erscheint in der Oktober-Nr.)
 Haudek, M. u. Stigler, R. (1910): *Pflügers Arch.*, **133**, 145.
 Ikejiri, K. (1933): I. Mitteil., (deutsch), *Nagasaki Igakkwai Zassi*, **11** Nr. 9. (erscheint in der September-Nr.)
 Maunoir, R. (1912): *Arch. internat. de physiol.*, **11**, 257.
 Matsui, K. (1926): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, **4**, 711.
 Otta, A. (1901): *Dtsch. Arch. klin. Med.*, **71**, 263.
 Rogers, F. T. (1915): *Americ. Journ. Physiol.*, **36**, 183.
 Sakaguchi, K. (1926): *Behandlung des Diabetes mellitus*, Tokyo.
 Sakauchi, M. (1932): *Journ. Biochem.*, **16**, 259.

Anmerkung: Ich verweise auf die zahlreiche auf Kohlenhydratstoffwechsel bei Hunger und Eiweiss-Fettdiät bezügliche Literatur, die in der genannten Mitteilung von Ikejiri angegeben ist.

ÜBER DIE ABFUHRWEGE DER IN DER LEBER PRODUZIERTEN SUBSTANZEN IN DIE BLUTBAHN.

I. Vergleichende Betrachtung des Harnstoffgehaltes im Blute und in der Lymphe.

VON

SUSUMU TSUNOO, HIDEO MACHIDA UND KENZO KUSUI.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo, Nagasaki.)

(Eingegangen am 4. September 1933)

Dass der Leber die Fähigkeit zukommt, Harnstoff zu bilden, ist eine schon lange anerkannte Tatsache. Die Meinungen sind nur hinsichtlich der Frage geteilt, ob die Leber der einzige Bildungsort des Harnstoffes ist, oder ob diese Fähigkeit auch anderen Organen resp. Geweben zugeschrieben werden kann. Aber nach der Konstatierung von Bollmann, Mann und Magath (1924), dass beim hepatektomierten Hunde die Harnstoffbildung fast ganz aufgehoben wird, darf man zur Zeit die Leber—wenigstens beim Hunde—wohl als die Hauptbildungsstelle des Harnstoffes betrachten, während die extrahepatische Harnstoffbildung praktisch ausser Acht gelassen werden kann.

Trotz der Fülle der Beobachtungen über den deutlichen Anstieg des Harnstoffspiegels im Blute und die vermehrte Ausscheidung dieser Substanz im Harn nach Darreichung von Aminosäuren erfuhr die Frage, auf welchen Wegen der Übertritt des Harnstoffes aus der Leber ins Blut vor sich geht, unseres Wissens bisher keine Untersuchung. Daher beschäftigten wir uns in der vorliegenden Arbeit mit diesem Problem. Zu diesem Zweck bestimmten wir in quantitativer Weise Rest- und Harnstoff-N im peripheren Blut und gleichzeitig in der Lymphe aus der Ductus thoracicus-Fistel nach Verabreichung einer Aminosäurenlösung. Aus der Feststellung des Zeitpunktes, zu dem sich der Anstieg der obengenannten Substanzen im Blut resp. in der Lymphe einstellt,

und der Verfolgung des weiteren Verhaltens derselben Substanzen versuchten wir unser Problem aufzuklären.

VERSUCHSERGEBNISSE.

Im einzelnen gestalteten sich die Versuche folgendermassen: Einem Hunde, der einige Tage lang vor dem Versuche mit einer bestimmten Nahrung gefüttert worden war, entnahm man im nüchternen Zustand eine kleine Menge Blut zur Kontrollbestimmung von Rest- und Harnstoff-N. Dann wurde dem Tier eine bestimmte Menge Aminosäurenlösung mit Magenschlauch im Laufe von 5 Minuten einverleibt; weiter wurde der Rest- und Harnstoff-N im Blut aus den Femoralvenen fortlaufend bestimmt. Nach einigen bis mehreren Tagen wurde demselben Hunde in der Rückenlage eine Ductus thoracicus-Fistel angelegt. Nachdem eine bestimmte Menge Lymphe angesammelt, und auch eine Blutportion entnommen worden war, wurde die gleiche Menge von derselben Aminosäurenlösung wie das vorige Mal mit Magenschlauch eingeführt. Dann wurde die Lymphe, die innerhalb einer Stunde, einigemal auch innerhalb einer Viertel- oder einer halben Stunde, aus der Fistel herauskam, fortlaufend angesammelt; am Ende jeder Ansammlungsperiode wurde eine Blutportion entnommen und der entsprechenden Lymphe gegenübergestellt. Jede Blut- und Lymphportion wurde mit Oxalat versetzt. Zur Bestimmung des Rest-N wurden Oxalatblut und -Lymphe mit Trichloressigsäure enteiweissst. Der Stickstoff im enteiweissten Filtrat wurde nach Kjeldahl bestimmt. Der Harnstoff-N im Blut und in der Lymphe wurde nach der van Slyke-Cullenschen Methode ermittelt.

Zur Herstellung der verabreichten Aminosäurenlösungen wurde Casein mit Schwefelsäure hydrolysiert und dann von der Schwefelsäure mit Barytwasser befreit. Der Gehalt dieser Lösungen an Amino-N wurde nach van Slyke bestimmt. Die Lösungen wurden vor Verabreichung mit N/10 NaOH gegen Lackmuspapier neutralisiert.

Die Versuchsergebnisse sind in einer Tabelle zusammengestellt. Im nüchternen Zustand beträgt der Harnstoff-N in der Lymphe 0,0079–0,0117%, im Blut 0,0107–0,0133%. Also besteht, mit der

Hunde. Nr.	Datum	Dargestellte Amino-N- Menge g	Zeit		Lymphe				Blut	
			Std.		Menge ccm	Aussehen	R-N %	(+) U-N %	R-N %	(+) U-N %
20,0 kg I ♂	3/X (32)	0,941	vor						0,0280	0,0126
			N.d. A-S-V.	1					0,0315	0,0140
				2					0,0498	0,0224
				3					0,0350	0,0187
				4					0,0310	0,0149
	16/X (32)	0,941	vor		15		0,0260	0,0117	0,0280	0,0121
			Nach der Amino- säureverabrei- chung	1	30	leicht rötlich gefärbt	0,0320	0,0135	0,0315	0,0131
				2	13	"	0,0380	0,0192	0,0500	0,0234
				3	14	"	0,0350	0,0164	0,0380	0,0174
				4	20	"	0,0320	0,0140	0,0340	0,0140
									0,0350	0,0133
									0,0410	0,0156
14,5 kg II ♂	7/XII (32)	0,967	vor						0,0450	0,0173
			N.d. A-S-V.	1/2					0,0510	0,0217
				1					0,0450	0,0182
				2					0,0410	0,0161
				3						
	10/XII (32)	0,967	vor		27	milchig	0,0230	0,0110	0,0340	0,0126
			Nach d. Aminosäure- renverabreich.	1/4	14	"	0,0230	0,0112	0,0350	0,0128
				1/2	15	"	0,0240	0,0117	0,0360	0,0128
				1	26	leicht gelblich- braun	0,0270	0,0131	0,0360	0,0131
				2	55		0,0380	0,0168	0,0380	0,0131
				3	46	"	0,0430	0,0170	0,0390	0,0149
				4	43	"	0,0470	0,0187	0,0444	0,0168
13,6 kg III ♂	9/I (33)	0,923	vor						0,0340	0,0129
			N.d. A-S-V.	1/2					0,0380	0,0135
				1					0,0410	0,0154
				2					0,0480	0,0168
				3					0,0510	0,0198
	11/I (33)	0,923	vor		15	milchig	0,0190	0,0079	0,0270	0,0107
			Nach d. Aminosäure- renverabreich.	1/2	14	"	0,0240	0,0103	0,0300	0,0126
				1	14	"	0,0290	0,0124	0,0330	0,0140
				2	28	"	0,0310	0,0149	0,0360	0,0163
				3	38	"	0,0340	0,0149	0,0440	0,0182
				4	28	"	0,0300	0,0140	0,0380	0,0168
				5	23	"	0,0260	0,0117	0,0320	0,0142

* Vor der Operation zur Anlegung der Ductus thoracicus-Fistel wurden 7,0 ccm 1%iges Morphinum hydrochloricum subkutan injiziert.

Angabe von Schöndorff (1899) übereinstimmend, kein grosser Unterschied zwischen Blut und Lymphe. Der Gehalt an Rest-N scheint in der Lymphe etwas kleiner zu sein als im Blut. $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{2}$ Stunde nach Verabreichung der Aminosäuren steigt der Harnstoff-N in Blut und Lymphe noch nicht deutlich an. Erst nach 1 Stunde kann man eine unbezweifelbare Steigerung in den beiden Körperflüssigkeiten konstatieren. Da diese Steigerung im Blut auch in den Fällen, in denen die Lymphe aus der Fistel nach aussen entleert wurde, fast unverändert auftritt, besteht also kein Zweifel darüber, dass der Harnstoff aus der Leber direkt in die Blutbahn übertreten kann. Die Steigerung in der Lymphe kann man entweder durch direkten Übertritt des Harnstoffes aus der Leber in die Lymphbahn oder durch indirekten Übertritt, d. h. durch Übergang des in die Blutbahn eingetretenen Harnstoffes weiter in die Lymphbahn, erklären. Den letzteren Vorgang muss man selbstverständlich annehmen, wenn der Harnstoffgehalt im Blut überhaupt zunimmt. Ob der erstere Prozess daneben auch vor sich geht, ist dagegen schwer zu entscheiden. Aber aus den Versuchen I und II kann man ersehen, dass im Anfangsstadium beider Versuche die Zunahme des Harnstoffgehaltes in der Lymphe etwas deutlicher ist. Wenn man weiter in Betracht zieht, dass die Lymphe in einer ganzen Zeitperiode angesammelt wird, während die Blutportion nur aus dem letzten Abschnitt derselben Versuchsperiode stammt, so macht man vielleicht keinen grossen Fehler, wenn man annimmt, dass die Lymphe, die zeitlich streng einer gegebenen Blutportion entspricht, eine noch grössere Konzentration der Harnstoffes zeigen kann, da die Harnstoffkonzentration des Versuchsbeginns allmählich in die Höhe steigt. Aus dieser Erwägung darf man höchst wahrscheinlich schliessen, dass der Harnstoff teilweise auch direkt aus der Leber in die Lymphbahn übergehen kann.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Wenn man Hunden eine bestimmte Menge Aminosäurenlösung verabreicht, so steigt der Harnstoffgehalt in Blut und Lymphe an.

2. Die Zunahme des Harnstoffgehaltes in der Lymphe kommt teils durch sekundären Übertritt des von der Leber in die Blutbahn abgegebenen Harnstoffes, teils durch direkten Übertritt desselben aus der Leber in die Lymphbahn zustande.

LITERATUR.

- Bollmann, Mann und Magath (1924): Amer. Jl. of Physiol., **69**, 371.
Schöndorff (1899): Pflügers Archiv, **74**, 307.

ÜBER DIE ABFUHRWEGE DER IN DER LEBER PRODUZIERTEN SUBSTANZEN IN DIE BLUTBAHN.

II. Vergleichende Betrachtung des Zuckergehaltes in Blut, Lymphe und Galle.

VON

SUSUMU TSUNOO, HIDEO MACHIDA UND KENZO KUSUI.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo, Nagasaki.)

(Eingegangen am 4. September 1933)

Nachdem wir in der 1. Mitteilung (1934) zum Schluss gekommen waren, dass der Harnstoff von der Leber nicht nur in die Blutbahn, sondern auch teilweise direkt in die Lymphbahn abgegeben werden kann, beschäftigten wir uns nun mit der weiteren Frage, auf welchen Wegen die Glukose, die in der Leber mobilisiert wird, in die Blutbahn übertritt. Als Gegenstand der Untersuchung wurde die Adrenalinhyperglykämie gewählt, da nach Falta und Priestley (1911), Frank und Isaac (1911) und Michaud (1911) die Zuckerquelle bei Adrenalinhyperglykämie ausschliesslich in der Leber gesucht werden muss. Nach Yanagawa (1916) soll die vermehrte Lymphmenge, die nach Adrenalininjektion aus der Ductus thoracicus-Fistel herauskommt, auch grösstenteils der vermehrten Lymphbildung in der Leber zuzuschreiben sein.

Für unsere Frage muss die Arbeit von Osato (1921) in Betracht gezogen werden. Er konnte sowohl bei normal gefütterten als auch bei hungernden Tieren durch subcutane Injektion von 0,5–1,0 ccm Adrenalin pro kg Körpergewicht eine deutliche Hyperglykämie hervorrufen. Dabei ergab sich eine gewisse Gesetzmässigkeit, insofern als im Stadium des ansteigenden Zuckergehaltes der Blutzucker eine mehr oder weniger höhere Konzentration als der Lymphzucker aufwies, während im Stadium des absteigenden Zuckergehaltes das umgekehrte Verhältnis beobachtet wurde. Nach

Osato ist dabei die Blutzuckersteigerung die primäre Erscheinung, während die Zunahme des Zuckergehaltes der Lymphe nur als eine sekundäre Folgeerscheinung zu betrachten ist.

In der vorliegenden Arbeit soll nun erforscht werden, ob die Zuckerzunahme in der Lymphe bei der Adrenalinhyperglykämie tatsächlich bloss als eine sekundäre Erscheinung angesehen werden muss, oder ob die Glukose von der Leber ausser in die Blutbahn auch direkt in die Lymphbahn übertreten kann. Nebenbei wird hier auch berücksichtigt werden, ob und wie der Zuckergehalt der Galle bei der Adrenalinhyperglykämie beeinflusst wird, da eine solche Beobachtung zur Entscheidung der viel unstrittenen Frage über "Paracholie" oder "Parapedese" beitragen kann.

VERSUCHSERGEBNISSE.

Versuchsreihe 1.

In der Versuchsreihe wurde Hunden, die mehrere Tage gleichmässig gefüttert worden waren, Adrenalinum hydrochloricum Sankyo (1:1000) in der Dosis von 0,2 ccm pro kg Körpergewicht im nüchternen Zustand subkutan injiziert. Der Blutzucker wurde vor und nach der Injektion mittels der alten Bangschen Methode fortlaufend bestimmt. Nachdem festgestellt worden war, dass unsere Dosis gross genug ist, Hyperglykämie hervorzurufen, wurde mehrere Tage später denselben Hunden, ebenfalls im nüchternen Zustand, eine Ductus thoracicus-Fistel angelegt und dann Adrenalin in derselben Dosis appliziert. Der Zuckergehalt wurde nun im Blut und in der Lymphe fortlaufend bestimmt. Da zur Zuckerbestimmung nur eine kleine Menge Lymphe genügt, so wurde in der vorliegenden Arbeit die Lymphe nicht so lange angesammelt, wie in der I. Mitteilung, sondern nur derjenige Anteil der Lymphe, der dem letzten Abschnitt einer Beobachtungsperiode angehört, zur Untersuchung gebraucht, so dass Lymphe und Blut hinsichtlich der Entnahmezeit ziemlich genau miteinander übereinstimmten. Die Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt.

Aus der Tabelle ergibt sich, dass schon die Operation allein — Anlegung einer Ductus thoracicus-Fistel — den Zuckerspiegel des

TABELLE 1.

Hund	Zeit Minuten		Zucker %				
			Datum	im Blut	Datum	im Blut	in der Lymphe
Nr. 1 7,2 kg ♀	vor der Injektion			0,124		0,124	0,142
	Nach der Injektion	15		0,125		0,173	0,166
		30		0,130		0,197	0,207
		45		0,138		0,212	0,224
		60	11/XI (32)	0,167	20/XI (32)	0,224	0,332
		90		0,172		0,212	0,229
		120		0,229		0,231	0,237
		150		0,235		0,226	0,232
		180		0,228		0,202	0,228
Nr. 2 7,9 kg ♂	vor d. Oper.			—		0,116	—
	vor d. Inj.			0,115		0,150	0,178
	Nach der Injektion	5		0,125		0,142	0,186
		10		0,125		0,139	0,173
		15		0,122		0,144	0,186
		20		0,129		0,141	0,181
		30		0,138		0,155	0,205
		45	26/XI (32)	0,140	3/XII (32)	0,163	0,230
		60		0,146		0,172	0,254
		90		0,165		0,187	0,250
		120		0,171		0,181	0,256
		150		0,182		0,196	0,239
		180		0,179		0,211	0,242

Blutes steigern kann. Durch Adrenalin steigt der Zuckerspiegel sowohl im Blut als auch in der Lymphe noch weiter an. Dabei ist sehr beachtenswert, dass die Steigerung des Zuckerspiegels sich beim Hunde Nr. 2 in der Lymphe früher einstellte und dabei auch ausgeprägter war.

Versuchsreihe 2.

Einem mit einer bestimmten Nahrung gefütterten Hunde wurde eine Gallenblasenfistel angelegt. Dann beobachteten wir

mehrere Tage, wie die Galle aus der Gallenblasenfistel herausfloss. Nach Feststellung eines guten Gallenabflusses wurde der Hund im nüchternen Zustand in einen Hängeapparat eingespannt, um die Galle während des Versuches ohne Hindernis herausfließen zu lassen; dann wurde Adrenalin in derselben Dosis wie bei Versuchsreihe 1 subcutan injiziert. Der Zuckergehalt im Blut und in der Galle wurde in diesem Versuche nicht nach Bang, sondern nach Hagedorn-Jensen bestimmt, da die Bangsche alte Methode bei der Galle wegen des starken Schäumens während des Kochens versagte. Wie man aus Tabelle II ersehen kann, steigt der Zuckerspiegel nicht nur im Blut, sondern auch in der Galle an. In diesem Versuche ist sogar die Zuckerzunahme in der Galle viel ausgeprägter.

TABELLE II.

Hund Nr. 3, ♂, 5,9 kg.

20/II. 33. Anlegung der Gallenblasenfistel.

23/II. 33. 1,15 ccm Adrenalin subcutan injiziert.

Zeit Minuten		Zucker %	
		im Blute	in der Galle
vor		0,103	0,080
Nach der Injektion	5	0,110	0,086
	10	0,113	0,085
	15	0,114	0,084
	20	0,114	0,102
	30	0,111	0,109
	45	0,110	0,125
	60	0,110	0,133
	90	0,136	0,135
	120	0,135	0,195
	150	0,131	0,190
	180	0,111	0,176

Versuchsreihe 3.

Zuerst wurde den Hunden eine Gallenblasenfistel angelegt. Nach mehreren Tagen wurden sie in Rückenlage fixiert, um eine

Ductus thoracicus-Fistel anzulegen. Nun wurde vor und nach der Adrenalininjektion der Zuckergehalt in Blut, Lymphe und Galle fortlaufend mittels der Hagedorn-Jensenschen Methode bestimmt. Da die Tiere in dieser Versuchsreihe zwecks Gewinnung der Lymphe in der Rückenlage dauernd fixiert werden mussten, konnte die Galle nicht mehr spontan herausfließen; also wurde sie mit einer Tuberkulinspritze, die statt der Nadel mit einem langen Gummischlauch versehen wurde, herausgesogen. Dabei wurde nur der Anteil der Galle, der möglichst genau dem Zeitpunkt, zu dem auch Blut und Lymphe untersucht wurden, angehört, zur Untersuchung gebraucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle III und IV zusammengestellt.

In beiden Versuchen wurde Zunahme des Zuckergehaltes in allen drei Körperflüssigkeiten konstatiert. Bei Hund Nr. 4 geht

TABELLE III.

Hund Nr. 4, ♂, 5,06 kg.

20/II. 33. Anlegung der Gallenblasenfistel.

26/II 33. Anlegung der Ductus thoracicus-Fistel und dann 1,0 ccm Adrenalin subcutan injiziert.

Zeit Minuten		Zucker %		
		im Blute	in der Lymphe	in der Galle
vor d. Oper. Duct. thor.-F.		0,109	—	0,057
vor d. Injekt.		0,112	0,125	0,141
Nach der Injektion	5	0,113	0,124	0,134
	10	0,113	0,126	0,141
	15	0,121	0,133	0,124
	20	0,119	0,139	0,110
	30	0,118	0,148	0,135
	45	0,167	0,175	0,250
	60	0,200	0,190	0,179
	90	0,211	0,247	0,151
	120	0,215	0,280	0,146
	150	0,222	0,280	0,158
	180	0,208	0,294	0,104

TABELLE IV.

Hund Nr. 5, ♂, 14,0 kg.

5/III 33. Anlegung der Gallenblasenfistel.

9/III 33. Anlegung der Ductus thoracicus-Fistel und dann 2,8 cem Adrenalin subcutan injiziert.

vor d. Oper. Ductus thor.-F.		0,110	—	0,056
Nach der Operation	direkt n.	0,102	0,127	0,068
	10	0,104	0,138	0,090
	20	0,104	0,132	0,095
	30	0,102	0,130	0,086
	60	0,102	0,130	0,095

Adrenalininjektion!

Nach der Injektion	5	0,152	0,152	0,121
	10	0,157	0,161	0,147
	20	0,166	0,215	0,172
	30	0,170	0,217	0,165
	45	0,173	0,234	0,187
	60	0,168	0,232	0,183
	90	0,159	0,221	0,136
	120	0,156	0,223	0,136
	150	0,152	0,183	0,141
	180	0,125	0,161	0,141

die Steigerung des Zuckerspiegels in der Lymphe der Steigerung in Blut und Galle voran. Dabei ist auch der Grad der Zuckerrücknahme in der Lymphe am stärksten. Dasselbe Verhalten kann auch bei Hund Nr. 5, wenn auch weniger ausgeprägt, festgestellt werden.

Wenn man die gesamten Ergebnisse in Betracht zieht, so kann man ohne weiteres anerkennen, dass die Glukose, die durch die Adrenalininjektion von der Leber mobilisiert wird, direkt in die Blutbahn übergehen kann, da der Blutzuckerspiegel auch bei Abfluss der Lymphe nach aussen in die Höhe steigt. Auch die Zuckerrücknahme der Galle muss dem Zucker, der von der Leber nach den Gallenwegen abgegeben wurde, zugeschrieben werden. Nun muss also die Quelle des vermehrten Zuckergehaltes in der

Lympe gesucht werden. Da die Hyperglykämie selbstverständlich als sekundäre Folgeerscheinung Zuckerzunahme in der Lympe hervorrufen kann, so ist die nun zu entscheidende Frage: ob die Zuckerzunahme in der Lympe ausschliesslich dieser sekundären Erscheinung zugeschrieben werden muss, oder ob ausserdem die Glukose bei der Adrenalininjektion aus der Leber auch direkt in die Lymphbahn übergehen kann. Wie oben hervorgehoben, zeigen die Versuche 2, 4 und 5 mit der grössten Wahrscheinlichkeit, dass die letztere Möglichkeit nicht abgelehnt werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Bei der Adrenalinhyperglykämie steigt der Zuckerspiegel nicht nur im Blut, sondern auch in Lympe und Galle an.
2. Der Zucker, der durch Adrenalin von der Leber mobilisiert wird, geht teils direkt, teils indirekt — auf dem Umwege der Lymphbahn — ins Blut über.

LITERATUR.

- Falta und Priestley (1911): Berl. Klin. W., 2192.
Frank und Isaac (1911): Schmiedebergs Archiv, 64, 274.
Michaud (1911): Verhandl. des Kongr. f. inn. Med., 28, 561.
Osato, S. (1921): Tohoku Journ. of exper. Med., 2, 489.
Tsunoo, S., Machida, H. und Kusui, K. (1934): J. of Biochem., 19, 231.
Yanagawa, H. (1916): J. of Pharm. and exper. Ther., 9, 75.

EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DIE WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION DES HARNS.

VON

TSUNEO KURAMOTO.

(Aus dem biochemischen Institut Okayama, Vorstand:
Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 30. September 1933)

Durch die eingehenden Untersuchungen von Itoo(1930–1932) wurde klargestellt, dass die Gallensäure die Wasserstoffionenkonzentration im Organismus reguliert, indem sie den enterohepatischen Kreislauf bildet.

Nach Itoo soll die Reaktion des Körpersaftes durch überschüssige Zufuhr von Gallensäure, z. B. durch experimentellen Stauungsikterus, nach der alkalischen Seite hin verschoben werden.

Bekanntlich ist das sekundäre Phosphat hauptsächlich im Körpersaft und das primäre Phosphat überwiegend im Harn enthalten. Durch die Untersuchung von Fuziwara(1931) wurde bewiesen, dass die Phosphorsäure bzw. das sekundäre Phosphat im Harn durch Zufuhr von Gallensäure vermehrt ausgeschieden wird, indem der Nucleinstoffwechsel im Organismus durch die Gallensäure gesteigert wird, wie Karasawa(1926) Hatakeyama(1927) und Kawada(1931) in ihren Versuchen nachgewiesen haben.

Der PH des Harns muss also durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert werden, da ja seine Reaktion gegen Lakmus alkalisch ist. In diesem Sinne habe ich den PH des Hundeharns unter intravenöser Zufuhr von Cholsäure mittelst der Chinhydronmethode nach Itano(1929/30) untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurde eine kräftige Hündin von 11 kg Körpergewicht verwendet, die vor und während der Versuche mit einer bestimmten Nahrung gefüttert wurde. Die Nahrung bestand aus

200 g Reis, 100 g trocknen Fischen, 25 ccm Shoyusuppe aus Soyabohnen und 1000 ccm Wasser. Morgens, in der nüchternen Zeit wurde der Harn der Hündin durch Katheterisieren entnommen und als Kontrolle sein spezifisches Gewicht sowie sein P_{H_2} nach Itano (1923/30) bestimmt. Dann wurde der Hündin 1 ccm einer 1%igen *Na*-Cholatlösung pro Kilo intravenös injiziert und je nach 1 oder 2 Stunden der Harn mittelst des Katheters entnommen. Sein spezifisches Gewicht und sein P_{H_2} wurden bestimmt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Aus den Tabellen ist ersichtlich, dass der P_{H_2} des Harns des nüchternen Tieres 6,5–6,7 und sein spezifisches Gewicht 1016–1020 beträgt. Der P_{H_2} des Harns wird durch Zufuhr von Cholsäure allmählich gesteigert und erreicht in der 4.—5. Stunde sein Maximum, um nach 8–9 Stunden wieder auf den Anfangswert oder sogar auf einen niedrigeren Wert herabzusinken.

Der P_{H_2} beträgt in der ersten Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure 6,893–6,997, in der zweiten 7,170–7,309, in der dritten 7,704–7,742, in der vierten und fünften 7,499–7,881, in der sechsten und siebenten 6,927–7,274 und in der achten und neunten 6,477–6,667.

Das spezifische Gewicht erreicht ebenfalls in der 4.—5. Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure sein Maximum und beträgt dann 1028–1034.

Die Steigerung des P_{H_2} -Wertes geht mit der des spezifischen Gewichtes fast parallel.

Durch die Zufuhr von Cholsäure wird die saure Reaktion des Harns der Hündin alkalisch, was höchstwahrscheinlich auf der Vermehrung des sekundären Phosphates beruht, da durch Zufuhr von Cholsäure der Nucleinstoffwechsel gefördert und die Verteilung der Alkalien im Organismus durch diesen verändert wird.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der P_{H_2} des Harns der Hündin wird durch Zufuhr von Cholsäure beträchtlich gesteigert.

2. Das spezifische Gewicht des Harns wird ebenfalls parallel

Hund A. 11 kg.

Nr. des Versuches	Stunde nach Zufuhr der Cholsäure	Harnmenge (cem)	spez. Gew.	P _H (18°C)
I	vor	21,0	1020	6,581
	2	16,3	1022	7,170
	4	11,0	1030	7,499
	6	13,6	1022	7,153
	8	13,2	1019	6,598
II	vor	174,0	1016	6,702
	1	12,0	1023	6,893
	3	20,0	1028	7,725
	5	20,8	1034	7,846
	7	13,0	1025	6,962
	9	21,0	1016	6,477
III	vor	197,0	1017	6,667
	1	12,0	1020	6,893
	2	10,5	1024	7,291
	4	21,5	1028	7,611
	6	16,0	1023	7,274
	8	16,2	1020	6,633
IV	vor	30,0	1018	6,737
	1	12,5	1021	6,945
	3	18,3	1029	7,742
	5	14,6	1034	7,881
	7	11,5	1027	6,979
	9	17,0	1017	6,667
V	vor	51,0	1018	6,633
	2	15,8	1024	7,309
	4	12,0	1034	7,829
	6	14,5	1023	7,205
	8	14,0	1019	6,615
VI	vor	35,0	1018	6,633
	1	11,8	1023	6,997
	3	21,0	1030	7,707
	5	16,0	1035	7,829
	7	13,5	1027	6,927
	9	18,5	1018	6,511

mit dem Wert des PH erhöht, um dann wieder zu seinem Anfangswert zurückzukehren; sein Maximum wird in der 4.-5. Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure erreicht.

LITERATUR.

- Fuziwara, K. (1931): *Jl. of Bioch.*, **13**, 43.
Hatakeyama, T. (1927): „ **8**, 261.
Itano, A. (1929/30): *Ber. d. Ohara Inst.*, **4**, 19, u. **4**, 471.
Ito, T. (1930): *Arb. a. d. med. Univ. Okayama*, **2**, 103.
„ (1931): „ **2**, 572.
„ (1932): *Bioch. Zschr.*, **254**, 50.
Karasawa, R. (1926): *Jl. of Bioch.*, **6**, 139.
Kawada, Y. (1931): „ **13**, 133.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER TAUROCHOLSÄURE AUS FISCHGALLE.

VON

HIROSHI MAKINO.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 30. September 1933)

Durch die Forschungsarbeit vieler Autoren ist bekannt geworden, dass die Gallensäure aus der Fischgalle hauptsächlich aus Taurocholsäure besteht. Dabei wurde aber die gepaarte Säure nur von Hammarsten (1904) aus Dorschgalle kristallinisch erhalten. Im Jahre 1927 hat Ikoma die Cholsäure aus der Galle von *Seriola quinqueradiata* isoliert, jedoch nichts über gepaarte Säure mitgeteilt.

Neuerdings hat Tanaka (1933) Taurocholsäure aus der Fistelgalle des Hundes kristallinisch isoliert und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften genau untersucht. Er fand, dass ihr Natriumsalz in der Lösung durch Mineralsäuren nicht frei gemacht wird.

Aus der Galle von *Seriola quinqueradiata* habe ich Natriumtaurocholat rein dargestellt. Dabei habe ich gefunden, dass das Natrium dieses Taurocholates beim Ansäuern mit Mineralsäuren nicht frei wird; es ergab sich also dasselbe Resultat wie bei der Hundegalle.

Dass aus β -naphthalinsulfoaminoäthansulfonsaurem Natrium durch Ansäuern mit Mineralsäure das Natrium nicht frei wird, ist schon von Bergell (1916) beobachtet worden. Das Salz der Taurocholsäure zeigt also die gleiche Eigenschaft wie das Salz von β -Naphthalinsulfotaurin.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Die frische Galle von *Seriola quinqueradiata*, 30 cem, wurde durch Alkoholzusatz mucinefrei gemacht und auf dem Wasserbade

eingedampft. Dann wurde sie mit einer 5%igen Eisenchloridlösung gefällt und filtriert. Das Filtrat wurde durch warme Sodalösung von Eisenchlorid befreit. Danach wurde es im Scheidetrichter unter Ansäuerung mit Salzsäure durch Benzol wiederholt extrahiert und dann mehrmals ausgeäthert. Diese Lösung wurde mit der Sodalösung neutralisiert, auf dem Wasserbade bis zum Volumen von ca. 15 ccm eingedampft und mit Kochsalz gesättigt. Nach dem Abkühlen wurde sie unter Zusatz von Äther geschüttelt und über Nacht kaltgestellt. Es schieden sich Kristalle in Form von glänzenden, langen Nadeln ab, die abgesaugt, mit kalter, gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und getrocknet wurden. Sie wurden dann mehrmals durch absoluten Alkohol von Kochsalz befreit. Die Ausbeute betrug 0,5 g.

Der Kristall wurde unter Zusatz von etwas Wasser und Äther aus Alkohol 7 mal umkristallisiert. Der erhaltene Nadelkristall schmilzt unter schwachem Aufschäumen bei 230–231°C. Er schmeckt süß und schwach bitter. Er ist schwefelhaltig und ergibt die Pettenkoferse und die nach Yamasaki modifizierte Hammarstense Reaktion.

Spezifische Drehung: 90 mg Subst. in 10 ccm Wasser, $\alpha = +0,44^\circ$, 2 dm. $[\alpha]_D^{20} = +24,44^\circ$.

Kristallwasserbestimmung: 168,7 mg Subst. verloren 10,8 mg H₂O.

C₂₆H₄₄O₇NSNa.2H₂O. Ber. 6,28% H₂O. Gef. 6,40% H₂O.

0,25 g Natriumtaurocholat wurden in 10 ccm Alkohol gelöst, unter Zusatz von etwas Wasser mit verdünnter Salzsäure schwach sauer gemacht und auf dem Wasserbade etwa 10 Minuten lang erwärmt. Dann liess man in der Kälte unter Zusatz von Äther kristallisieren. Diese Umkristallisation wurde 5 mal wiederholt. Der Kristall hat den Schmelzpunkt 230–231°C und reagiert in wässriger Lösung gegen Lakmus neutral.

Spezifische Drehung: 53 mg Subst. in 10 ccm Wasser, $\alpha = +0,25^\circ$, 2 dm. $[\alpha]_D^{20} = +24,53^\circ$.

Kristallwasserbestimmung: 99 mg Subst. verloren 6,3 mg H₂O.

C₂₆H₄₄O₇NSNa.2H₂O. Ber. 6,28% H₂O. Gef. 6,36% H₂O.

Analyse: 2,858 mg Subst.: 0,069 ccm N, 21,5°, 763 mm.

3,135 mg Subst.: 0,072 ccm N, 22,5°, 763 mm.

$C_{26}H_{44}O_7NSNa$. Ber. 2,61% N. Gef. 2,81% N, 2,66% N.

LITERATUR.

- Bergell, P. (1916): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **97**, 262.
Hammarsten, O. (1904): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **43**, 135.
Ikoma, S. (1927): Jl. of Biochem., **7**, 205.
Tanaka, T. (1933): Zeitschr. f. physiolog. Chem., **220**, 39.
Yamasaki, K. (1933): Jl. of Biochem., **18**, 1.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

XVII. On the Ability of Glycuronic Acid Formation in the Body of Guinea Pigs Fed on a Vitamin C Free Diet

By

JITSUICHI SHIMADA

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. Nagayama.)

(Received for publication, October 2, 1933)

I. INTRODUCTION.

Notwithstanding that O. Rygh and A. Rygh have reported that the methyl-narcotin and the irradiated narcotin have a prophylactic and curative effect upon experimental scurvy, none of the animals could survive over four weeks. They suggested, therefore, that another factor than the methyl-narcotin administration might be required to maintain normal life. Their narcotin theory was discussed by a number of authors, and there was seen no proof to support this theory. O. Rygh and A. Rygh have given the following explanation for the reason why the guinea pigs died within a short time without any scorbutic changes. When 10 γ of 30% methyl-narcotin and $\frac{1}{2}$ mg. of glycuronic acid were given to the guinea pigs fed on a vitamin C free diet, they survived over fifty days and their body weight increased as that of normal ones did. These facts indicate that, besides methyl-narcotin, glycuronic acid is required for normal growth. From the results of their investigation, it was concluded that the scorbutic guinea pigs had no ability for the synthesis of this acid although human beings were capable of it. It was stated therefore, that, the scurvy in the latter case could be cured solely by the supplement of the methyl-narcotin. In fact, they proved that the glycuronic acid reaction of the first day urine of the guinea pigs fed on a vitamin C free diet was distinctly positive while it became only a trace in the second week and became quite

negative on the third week of scurvy. It was suggested that the absence of glycuronic acid in urine is a symptom of scurvy, and that it will serve in the diagnosis of the disease.

Recently Maruyama (1933) reported that the scurvy of guinea pigs could not be protected by administration of methyl-nornarcotin and glycuronic acid lacton or menthol-glycuronic acid. Widmark and Glimstedt (1933) stated that the glycuronic acid reaction of the urine of the guinea pigs was strong positive throughout the scorbutic period.

The author has also tested the urine of guinea pigs fed on a vitamin C free diet for glycuronic acid.

II. EXPERIMENTAL ANIMALS AND FEEDING.

For the present experiment, male guinea pigs weighing from 500 to 600 gm. were used, and were fed on Sherman's vitamin C free diet with the supplement of boiled radish juice.

III. EXPERIMENTAL METHODS.

The 24 days urine was collected in a glass tube, added with toluene, and inserted into a vacuum flask into which ice had been put. Also water was given *ad libitum*.

Each 2 ccm of the urine was tested for glycuronic acid. Tollen's naphthoresorcinol reaction was used for the detection of glycuronic acid in the urine.

IV. EXPERIMENTAL RESULTS.

As seen in Table I, it was proved that the glycuronic acid reaction was generally positive throughout the scorbutic period.

V. CONCLUSIONS.

We can not agree with O. Rygh and A. Rygh who believe that the scorbutic guinea pig has no power to form glycuronic acid in his body.

TABLE I.

Animal No.			Body Weight		Lived for	The Intensity of Naphthoresorcinol Reaction in Each Scorbatic Day.																					
			In- itial	Final		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
			gm. 420	gm. 355	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	-	+	+	+
2			450	360	15	+	+		+	+		+	+		+		+		+	+		±				+	+
3			410	270	18		+		+		+		±	+		+	+	+	+		+		+		+	+	+
4			580	385	15	+		+	+		+		+		+		+		+		+		±				+
6			630	405	16		+	+	+		+		+		+		+		+		+						+
7			410	255	18	±		±	±		±		+		±		-		±		±		±				+
1			560	355	20		+		+		+		+		+		+		+		+		+	+	+	+	+
9			430	270	19		+	+		+		+		+		+		+		+		-		+	+	+	+
10			450	275	21	+		+	+		+		+		+		+		+		+		+	+	+	+	+
20			610	400	17	+		+		+		+		+		+		±		+		±		+	+	+	+
21																											

The intensity of Naphthoresorcinol reaction is indicated by ±, +, ++ for increasing degree of intensity, and by— for negative reaction. In autopsy findings, there were always seen remarkable scorbutic changes.

REFERENCES.

- Maruyama, S. (1933): Report in the scientific meeting of the Institute of Physical and Chemical Research.
- Rygh, O., Rygh, A. and Laland, P. (1932): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **204**, 105.
- Rygh, O. and Rygh, A. (1932): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **211**, 275.
- Shimada, J. (1933): *J. Biochem.* XVII, No. 3.
- Widmark and Glimstedt (1933): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **215**, 147.

Additional Writings:

We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expenses of this work, which have been defrayed from Ujun-Kwai.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

XVIII. On the Carbohydrate Tolerance of Guinea Pigs Fed on a Vitamin C Free Diet, and Changes in the Blood Sugar Content of the Animals after the Parenteral Administration of Adrenalin and Insulin.

By

JITSUICHI SHIMADA,

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, October 2, 1933)

I. INTRODUCTION.

Since Holst and Frölich (1907, 1912-13) were able to show that some restricted rations gave rise to experimental scurvy in guinea pigs, there has been achieved a remarkable development on the studies of vitamin C. On the carbohydrate metabolism, Collazo (1922) reported that the blood sugar of the guinea pigs fed on a vitamin C free diet was sometimes increased and was sometimes decreased. Palladin (1924) proved that the blood sugar of the scorbutic guinea pigs increased, and that the glycogen content in the liver decreased to a great extent. From these facts, he drew the conclusion that there should have been some disturbance of carbohydrate metabolism in experimental scurvy. Tomita (1928) has also obtained the same result as Palladin. But the basal diet, used by the authors, consisted exclusively of "Hafer" and water recommended by Holst and Frölich. Nagayama, Machida and Takeda (1928) reported that in general, no variation was found in the blood sugar content of the guinea pigs fed on Sherman's vitamin C free diet, though some of them showed an increase right before death. It was suggested also that the decrease of the liver glycogen at the end of experimental scurvy might be due to an inanition. Koga (1930) proved that it was quite true. Now I have performed a series of experi-

ments upon the carbohydrate tolerance of guinea pigs fed on a vitamin C free diet, and upon changes in the blood sugar content of the animals at the scorbutic period after the parenteral administration of adrenalin and insulin.

II. EXPERIMENTAL ANIMALS AND FEEDING.

Guinea pigs weighing about 500 gms. were previous to the experiment fed on Sherman's vitamin C free diet supplemented by some vegetables and with free access to water until their body weight and the amount of food taken daily become almost stationary. Next, each was put into a metabolism cage. For one week, Sherman's vitamin C free diet and fresh radish juice were given for the control experiment, and then the fresh radish was replaced by boiled radish for the scorbutic one.

III. EXPERIMENTAL METHODS.

For the determination of blood sugar, Horiuchi's modification of the Bang blood sugar method (1923) was employed. For the carbohydrate tolerance test, 0.4 ccm of 25% glucose solution (Merck) per 100 gm. of body weight was injected into the ear vein, and the blood sugar was determined at several intervals after the injection, i.e., 10', 30', 60', 90', and 120'. For the insulin and the adrenalin tests, 0.08 ccm of dilute insulin Lilly (1:20) and 0.08 ccm of dilute adrenalin Sankyo (1:10) per 100 gms. of body weight were subcutaneously injected respectively. The blood sugar contents of the control guinea pigs were determined (respectively) immediately before and at certain intervals after giving a definite amount of glucose, of insulin and of adrenalin. Then the blood sugar in the scorbutic period of the same animals as above was determined at 5 to 8 day interval. Sometimes the animals were slaughtered at the end of the scurvy, as the blood could scarcely be drawn, and were dissected.

IV. EXPERIMENTAL RESULTS.

A. *The carbohydrate tolerance in the experimental scurvy.*

The results are shown in Tables I, II, III, IV, V, VI, VII, and

TABLE I. Guinea pig No. 5.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Glucose injected	Before Injection	Blood Sugar Content %					Remarks	
						10'	1 ^h	1	1½	2		2½
16 IX												
17		510	12	gm.								
18		495	20									
19		485	17									
20		485	19									
21		480	18									
22		485	25									
23		485	18	0.475	0.102	0.239	0.194	0.116	0.112	0.105	0.109	
24	1	465	20									
25	2	455	17									
26	2	460	18									
27	4	460	19									
28	5	450	17									
29	6	430	18	0.425	0.110	0.229	0.189	0.113	0.117	0.109	0.099	
30	7	415	19									
1 X	8	415	17									Diarrhoea
2	9	400	15									
3	10	405	13									
4	11	400	12									
5	12	390	14									
6	13	390	15	0.400	0.092	0.229	0.200	0.118	0.109	0.113	0.102	Bloody faeces
7	14	390	6									
8	15	380	10									
9	16	360	8									
10	17	350	9									
11	18	340	5	0.350	0.109	0.360	0.265	0.167	0.116	0.125	0.127	Died
	19											

Autopsy findings:

Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, large intestine, and caecum; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

Diarrhoea

Bloody faeces

Died

TABLE II. Guinea pig No. 6.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Glucose injected	Before Injection	Blood Sugar Content %					Remarks	
						After Injection						
						10'	1h	1	1½	2		2½
16 IX	normal	gm.	gm.	gm.								
17		510	15									
18		490	10									
19		470	15									
20		460	17									
21		450	17									
22		435	11									
23		435	10									
24	1 X	430	11	0.425	0.104	0.247	0.180	0.133	0.131	0.118	0.119	
25		440	15									
26		435	19									
27		440	20									
28		435	23									
29		435	15									
30		430	16									
1 X		425	19									
2		425	15									
3		415	20									
4		425	16									
5		405	15		0.400	0.102	0.250	0.129	0.116	0.115	0.082	0.083
6		405	20									
7		395	15									
8		400	15									
9		400	16									
10		395	15		0.375	0.118	0.226	0.159	0.120	0.126	0.101	0.091
	385	10										

Diarrhoea

Bloody faeces

Died

Autopsy finding: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum and caecum; Enlargement of joints; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

TABLE III. Guinea pig No. 7.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Glucose injected	Before Injection	Blood Sugar Content %					Remarks	
						After Injection						
						10'	3 ^h	1	1½	2		2½
20 IX		gm.	gm.	gm.								
21		530	20									
22		515	25									
23		515	21									
24		505	27									
25		505	25									
26		510	28		0.106	0.264	0.184	0.090	0.086	0.103	0.107	
27		505	18	0.500								
28	1	490	21									
29	2	495	24									
30	3	490	18									
1 X	4	480	16									
2	5	475	18									
3	6	470	17									
4	7	470	16									
5	8	470	22		0.099	0.250	0.221	0.162	0.098	0.092	0.110	
6	9	450	18									
7	10	455	18									Diarrhoea
8	11	440	20									
9	12	435	19									
10	13	445	14									
11	14	430	16									
12	15	425	3		0.101	0.286	0.222	0.116	0.119	0.089	0.105	Bloody faeces
13	16	410	9									
14	17	400	8									
15	18	380	5									
16	19	370	4		0.125	0.392	0.341					Died

Autopsy finding: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, large intestine, and caecum; subcutaneous hemorrhage; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

TABLE V. Guinea pig No. 9.

Date	Scur- batic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Glucose injected	Before Injec- tion	Blood Sugar Content %					Remarks
						10'	1 ^h	1	1 $\frac{1}{2}$	2	
23 IX		560	gm.	gm.							
24		530	17								
25		520	21								
26		510	20								
27		515	19								
28		510	16								
29		520	18	0.525	0.110	0.265	0.255	0.240	0.200	0.185	0.110
30		515	15								
1 X	1	500	19								
2	2	490	20								
3	3	490	21								
4	4	495	21								
5	5	490	18								
6	6	490	17								
7	7	480	16								
8	8	460	20	0.475	0.115	0.295	0.259	0.223	0.210	0.125	0.125
9	9	450	15								
10	10	430	13								
11	11	435	14								
12	12	400	10								
13	13	390	9	0.400	0.113	0.285	0.265	0.240	0.130	0.150	0.112
											Diarrhoea
											Died

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, large intestine, and caecum; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

TABLE VI. Guinea pig No. 10.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Glucose injected	Blood Sugar Content						Remarks	
					Before In- jection	After Injection						
						10'	$\frac{1}{2}$ h	1	1 $\frac{1}{2}$	2		2 $\frac{1}{2}$
18 XI	normal	gm.	gm.	gm.								
19		470	16									
20		410	16									
21		390	20									
22		385	30									
23		395	30									
24		395	24									
25		415	28									
26		415	23									
27		420	25									
28		430	29									
29		430	22									
30		430	18									
		425	17	0,425	0,088	0,168	0,111	0,079	0,091	0,086	0,090	
1 XII	1	415	24									
2	2	415	25									
3	3	420	23									
4	4	420	24									
5	5	415	18									
6	6	400	20									
7	7	415	22									
8	8	395	18	0,300	0,082	0,157	0,112	0,089	0,076	0,084	0,071	
9	9	370	19								Diarrhoea	
10	10	380	20									
11	11	375	16									
12	12	365	15								Bloody	
13	13	365	15								faeces	
14	14	360	10	0,375	0,102	0,180	0,111	0,111	0,063	0,065	0,098	
15	15	350	6									
16	16	350	7									
17	17	355	8									
18	18	350	1	0,350	0,069	0,265	0,178	0,189	0,081	0,130	0,142	
19	19	340	1								Died	

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, large intestine, and caecum; Subcutaneous hemorrhage; Enlargement and hyperemia of left knee-joint; Enlargement of suprarenals.

in Fig. 1.

As is seen in the above tables and in Fig. 1, the blood sugar of the normal guinea pigs rose to a maximum at 10 minutes after

TABLE VII. Guinea pig No. 11.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Glucose injected	Blood Sugar Content %						Remarks	
					Before In- jection	After Injection						
						10'	$\frac{1}{2}$ h	1	1 $\frac{1}{2}$	2		2 $\frac{1}{2}$
25 XI	normal	gm.	gm.	gm.								
26		550	20									
27		535	26									
28		480	27									
29		500	30									
30		495	28									
1 XII		495	30									
2		500	15									
		495	20	0,500	0,114	0,240	0,216	0,119	0,083	0,091	0,101	
3	1	480	25									
4	2	490	23									
5	3	495	24									
6	4	500	22									
7	5	495	28									
8	6	485	28	0,475	0,111	0,282	0,212	0,153	0,111	0,093	0,116	
9	7	475	15									
10	8	440	20									
11	9	440	16									
12	10	430	15								Diarrhoea	
13	11	430	15									
14	12	410	13									
15	13	400	10								Bloody faeces	
16	14	395	9									
17	15	395	10	0,400	0,132	0,265	0,181	0,165	0,101	0,121	0,102	
18	16	400	3									
19	17	380	1									
20	18	390	2									
21	19	380	3									
22	20	380	5									
23	21	380	2	0,375	0,151	0,374	0,320	0,208			Died	

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, large intestine, and caecum; Subcutaneous hemorrhage; Enlargement and hyperamia of suprarenals.

the glucose injection, and returned to normal levels by the end of the second hour. There could be found no difference between the carbohydrate tolerance of the normal and the scorbutic period within the first to the second week, although it was proved that there were remarkable scorbutic changes in autopsy findings. On the other hand, there was seen a remarkable disturbance of the

Fig. 1.

(Table I. Guinea pig no. 5)

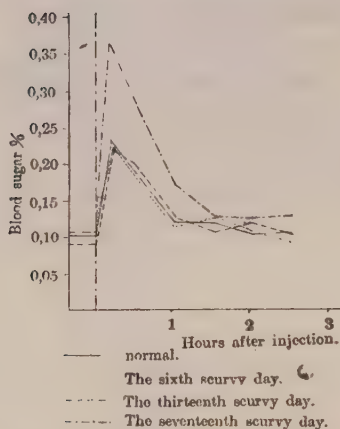
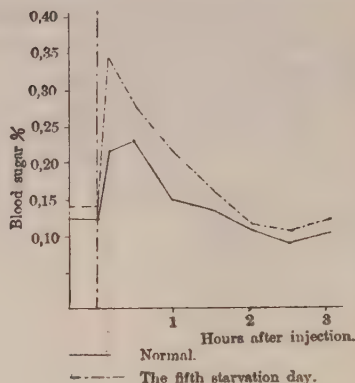


Fig. 2.

(Table VIII. Guinea pig no. 2)



sugar tolerance immediately before death. As the end period of the experimental scurvy, however, was generally accompanied with an inanition, I have examined the sugar tolerance of the fasted guinea pigs.

B. The carbohydrate tolerance of fasted guinea pigs.

The guinea pigs were fasted for a few days, and the sugar tolerance was determined in the same manner above mentioned.

As was shown in Table VIII and in Fig. 2, there was recognised a remarkable disturbance of sugar tolerance in almost the same degree as that of the end period of the scurvy. Therefore, it must be born in mind that the disturbance of the tolerance at the end of the disease may be due to an inanition.

C. The effect of insulin upon the blood sugar content of the scorbutic guinea pigs.

As was seen in the following Tables IX, X, XI, XII, XIII, and in Fig. 3, the blood sugar content showed the lowest value at the second to the third hour after the injection, and returned to normal levels by the end of the seventh hour. These data showed that the effect of insulin upon the blood sugar content of the scorbutic guinea pigs did not differ from the normal.

TABLE VIII.

Number of Animal	Date	Starvation Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Glucose injected	Blood Sugar Content %							
						Before In-jection	After Injection						
							10'	1 ^h	1	1½	2	2½	3
I	31 VIII		gm.	gm.	gm.								
	1 IX	1	380	20	0,375	0,085	0,174	0,160	0,115	0,114	0,126	0,119	0,101
	2	2	330	0									
	3	3	330	0									
	4	4	310	0									
	5	5	300	0									
	6	6	290	0	0,300	0,108	0,323	0,241	0,175	0,145	0,174	0,142	0,152
	7	7	270	0									
II	28 VIII		485	29	0,475	0,118	0,217	0,224	0,163	0,132	0,112	0,081	0,102
	29	1	450	0									
	30	2	430	0									
	31	3	400	0									
	1 IX	4	390	0									
	2	5	380	0	0,375	0,129	0,346	0,273	0,215	0,152	0,116	0,108	0,121
	3	6	380	0									
	4	7	370	0									
III	29 VIII		520	29									
	30		510	28									
	31		520	30									
	1 IX		510	25	0,500	0,101	0,257	0,228	0,141	0,159	0,118	0,127	0,111
	2	1	480	0									
	3	2	440	0									
	4	3	420	0									
	5	4	390	0									
	6	5	370	0	0,375	0,155	0,420	0,301	0,208	0,182	0,184	0,193	0,185
	7	6	360	0									
IV	1 IX		430	29	0,425	0,089	0,248	0,152	0,119	0,117	0,123	0,108	0,098
	2	1	380	0									
	3	2	360	0									
	4	3	350	0									
	5	4	340	0	0,350	0,091	0,308	0,261	0,206	0,159	0,121	0,088	0,111
	6	5	320	0									
	7	6	300	0									

D. The effect of adrenalin upon the blood sugar content of the scorbutic guinea pigs.

The results were shown in Tables XIV, XV, XVI, XVII, XVIII and graphically in Fig. 4.

TABLE IX. Guinea pig No. 1.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet Ingested	Amount of Insulin injected	Blood Sugar Content %										Remarks	
					Before Injection	After Injection										
						30'	1 ^h	1½	2	2½	3	4	5	6		7
7 I	normal	gm.	gm.	ccm.												
8		520	20													
9		470	28													
10		460	25													
11		455	28													
12		455	27													
13		445	30		0,0180	0,123	0,108	0,094	0,076	0,061	0,064	0,070	0,084	0,086	0,105	0,113
14		440	25													
15		430	10													
16		420	29													
17	430	21														
18	435	23														
19	425	24														
20	420	22														
21	425	20		0,0170	0,126	0,101	0,099	0,069	0,068	0,061	0,073	0,095	0,081	0,111	0,124	
22	410	10														
23	410	9														
24	405	18														
25	400	19														
26	390	15		0,0156	0,121	0,113	0,081	0,069	0,059	0,066	0,067	0,086	0,083	0,108	0,109	
27	370	3														
28	385	4														
29	370	5		0,0148	0,130	0,094	0,060									
30																

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

Diarrhoea

Bloody faeces

Died

TABLE X. Guinea pig No. 2.

Date	Scurvitic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Insulin injected	Before Injection	Blood Sugar Content %							Remarks			
						30'	1 ^h	1½	2	2½	4	4		5	6	7
I		gm.	gm.	ccm.												
24		600	24													
25		550	25													
26		535	28													
27		535	30'													
28		540	15													
29		535	20													
30		545	16													
31		545	17													
1	II	550	18	0.0220	0.093	0.087	0.078	0.069	0.075	0.064	0.055	0.056	0.058	0.067	0.108	
2		550	15													
3		535	19													
4		530	16													
5		530	15													
6		535	13													
7		535	16													
8		530	12													
9		515	10													
10		495	9	0.0198	0.095	0.098	0.062	0.060	0.053	0.060	0.061	0.072	0.066	0.092	0.097	Diarrhoea
11		470	19													
12		460	0													
13		450	9													
14		430	3	0.0172	0.099	0.101	0.066	0.056	0.069	0.067	0.063	0.081	0.067	0.087	0.091	Bloody faeces
15		390	2													
16		390	1													Died

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, large intestine, and caecum; Subcutaneous hemorrhage; Enlargement, and hyperemia of suprarenals.

TABLE XII. Guinea pig No. 4.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet Ingested	Amount of Insulin injected	Before Injection	Blood Sugar Content %								Remarks		
						After Injection										
						30'	1 ^h	1½	2	2½	3	4	5		6	7
11	II	gm.	gm.	ccm.												
12		600	19													
13		550	24													
14		550	27													
15		535	25													
16		540	23													
17		540	19													
18		535	20													
19		540	18	0.022	0.109	0.107	0.089	0.082	0.080	0.079	0.094	0.083	0.083	0.096	0.103	
20		500	9													
21		490	19													
22		500	21													
23		490	23													
24		480	25													
25		465	27													
26		465	26	0.0185	0.118	0.103	0.089	0.083	0.082	0.085	0.097	0.092	0.095	0.102	0.109	
27		445	23													
28		435	24													
29		420	16													
30		410	17													
31	III	410	10													
32		410	10													
33		400	15													
34		400	11	0.0160	0.120	0.114	0.083	0.079	0.084	0.093	0.083	0.087	0.082	0.094	0.112	Diarrhoea Bloody faeces Killed

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine; Subcutaneous hemorrhage; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

Diarrhoea

Bloody faeces
Killed

TABLE XIII. Guinea pig No. 5.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet ingested	Amount of Insulin injected	Before Injection	Blood Sugar Content %							Remarks		
						After Injection									
						30'	1 ^h	1½	2	2½	3	4		5	6
15 II		gm.	gm.	ccm.											
16		590	10												
17		545	18												
18		545	20												
19		550	20												
20		540	25												
21		535	19												
22		540	21												
23		535	23												
24		525	21	0.0300	0.110	0.101	0.076	0.065	0.053	0.049	0.051	0.071	0.079	0.081	0.091
25	I	535	10												
26	2	525	23												
27	3	520	16												
28	4	525	22												
29	5	510	20												
30	6	480	21												
31	7	455	16												
1 III	8	435	14												
2	9	430	13	0.0180	0.108	0.102	0.072	0.071	0.055	0.049	0.051	0.078	0.081	0.101	0.099
3	10	420	13												
4	11	410	15												
5	12	405	9												
6	13	390	10												
7	14	390	14	0.0156	0.099	0.083	0.080	0.068	0.061	0.053	0.051	0.079	0.089	0.071	0.102
8	15	380	12												
9	16	380	12												
10		380	12												
11		380	3	0.0152	0.120	0.103	0.085	0.069	0.049	0.059	0.076	0.096			Killed

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine; Subcutaneous hemorrhage; Enlargement and hyperemia of knee-joints and suprarenals.

Diarrhoea

Bloody faeces

Killed

TABLE XIV. Guinea pig No. 1.

Date	Scorbutic Day	Body Weight gm.	Diet Ingested gm.	Amount of Adrenalin injected ccm.	Before Injection	Blood Sugar Content %								Remarks		
						30'	1 ^h		2	2½	3	4	5		6	7
18 II	normal	645	23	0.0448	0.102	0.125	0.134	0.146	0.136	0.134	0.139	0.132	0.121	0.119	0.097	
19		595	30													
20		590	21													
21		565	21													
22		565	19													
23		570	16													
24		560	18													
25		560	19													
26	1	530	10	0.0384	0.105	0.121	0.140	0.148	0.148	0.131	0.141	0.121	0.126	0.112	0.103	Diarrhoea Killed
27	540	17														
28	535	18														
1 III	4	550	13													
2	5	510	12													
3	6	490	11													
4	7	480	15													
5	8	480	13													
6	9	460	10													
7	10	440	16													
8	11	445	9													
9	12	440	11													
10	13	430	10													

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine; Subcutaneous hemorrhage; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

z TABLE XV. Guinea pig No. 2.

TABLE XV. Guinea pig No. 2.																
Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet Ingested	Amount of Adrenalin injected	Before Injection	Blood Sugar Content %										Remarks
						30'	1 ^h	1½	2	2½	3	4	5	6	7	
20 II		gm.	gm.	ccm.												
21		515	22													
22		495	22													
23		475	17													
24		470	20													
25		475	25													
26		470	11													
27		475	19													
28		470	25													
I III		460	20													
1		470	10	0.0376	0.098	0.101	0.136	0.139	0.141	0.136	0.137	0.128	0.112	0.121	0.109	
2	1	430	10													
3	2	420	12													
4	3	435	20													
5	4	440	21													
6	5	435	23													
7	6	445	20	0.0356	0.088	0.112	0.129	0.130	0.142	0.143	0.131	0.138	0.101	0.112	0.110	
8	7	425	9													
9	8	420	10													
10	9	410	11													
11	10	410	12													
12	11	410	14	0.0328	0.101	0.115	0.134	0.135	0.138	0.144	0.132	0.131	0.132	0.128	0.099	
13	12	390	8													
14	13	380	10													
15	14	370	12													
16	15	370	15	0.0296	0.101	0.112	0.152	0.125	0.139	0.112						
17	16	365	0													
Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable loosening of the teeth.																
Diarrhoea																
Bloody faeces																
Died																

Autopsy findings:

Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine. Subcutaneous hemorrhage; Enlargement of suprarenals.

Diarrhoea

Bloody faeces

Died

TABLE XVI. Guinea pig No. 3.

Date	Scorbutic Day	Body Weight gm.	Diet Ingested gm.	Amount of Adrenalin injected ccm.	Before Injection	Blood Sugar Content %							Remarks					
						After Injection												
						30'	1 ^h	1 ¹ / ₂	2	2 ¹ / ₂	3	4		5	6	7		
22 II		540	21															
23		535	21															
24		540	20															
25		525	19															
26		535	20															
27		535	16															
28		530	20	0.0424	0.084	0.089	0.119	0.132	0.139	0.135	0.136	0.121	0.119	0.089	0.093			
1 III	1	525	10															
2	2	525	19															
3	3	520	13															
4	4	510	14															
5	5	495	15	0.0396	0.089	0.102	0.103	0.125	0.141	0.145	0.131	0.101	0.118	0.102	0.095			
6	6	465	13															
7	7	465	10															
8	8	435	11															
9	9	420	13															
10	10	425	12															
11	11	410	10															
12	12	400	9															
13	13	400	13															
14	14	390	11															
15	15	390	12	0.0312	0.091	0.101	0.111	0.135	0.142	0.123	0.138	0.125	0.107	0.101	0.089	Killed		

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

Diarrhoea

Bloody faeces

Killed

TABLE XVII. Guinea pig No. 4.

Date	Scorbutic Day	Body Weight gm.	Diet Ingested gm.	Amount of Adrenalin Injected ccm.	Blood Sugar Content %										Remarks	
					Before Injection	After Injection										
						30'	1 ^h	2	2½	3	4	5	6	7		
26 II		545	20													
27		535	19													
28		515	18													
1 III		510	22													
2	normal	505	24													
3		505	24													
4		505	24													
5		505	23													
6		510	23													
7		510	24													
8		505	17	0,0404	0,133	0,135	0,143	0,134	0,136	0,137	0,139	0,126	0,124	0,098		
9	1	485	22													
10	2	485	22													
11	3	485	22													
12	4	480	21													
13	5	480	21	0,0384	0,129	0,141	0,143	0,143	0,133	0,137	0,133	0,133	0,116	0,103		
14	6	465	15													
15	7	465	17													
16	8	460	24													
17	9	460	17													
18	10	445	13	0,0356	0,121	0,139	0,146	0,141	0,138	0,131	0,132	0,134	0,128	0,101		
19	11	430	12													
20	12	425	18													
21	13	425	19													
22	14	415	19													
23	15	410	17													
24	16	405	16	0,0324	0,131	0,140	0,143	0,139	0,139	0,138	0,131	0,127	0,125	0,087	Diarrhoea	
25	17	380	14												Bloody faeces	
26	18	380	1												Died	

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine; Enlargement and hyperemia of suprarenals.

Diarrhoea
Bloody faeces
Died

TABLE XVIII. Guinea pig No. 5.

Date	Scorbutic Day	Body Weight	Diet Ingested	Amount of Adrenalin injected	Before Injection	Blood Sugar Content %										Remarks
						After Injection										
						30'	1 ^h	1½	2	2½	3	4	5	6	7	
1	normal	470	27 gm.	c.cm.												
2		460	26													
3		455	23													
4		455	27													
5		440	29													
6		440	24													
7		445	23													
8		450	25													
9		455	27	0.0364	0.123	0.133	0.169	0.143	0.160	0.137	0.149	0.139	0.141	0.137	0.122	
10	normal	440	17													
11		445	20													
12		455	18													
13		450	21													
14		455	22													
15		450	24	0.0356	0.128	0.141	0.168	0.160	0.159	0.153	0.146	0.141	0.132	0.137	0.121	
16		445	10													
17		455	16													
18		430	19													
19		435	17	0.0348	0.121	0.137	0.172	0.159	0.161	0.152	0.142	0.148	0.139	0.132	0.118	Diarrhoea
20		415	19													
21		410	10													
22		490	8	0.0312	0.118	0.140	0.171	0.147	0.158	0.147	0.148	0.141	0.135	0.135	0.125	Bloody faeces

Autopsy findings: Looseness of teeth; a remarkable hemorrhage in the duodenum, caecum, and large intestine; Subcutaneous hemorrhage; Enlargement and hyperemia of r. knee-joint and suprarenals.

Diarrhoea

Bloody faeces

Fig. 3. (Table XI. Guinea pig no. 5)

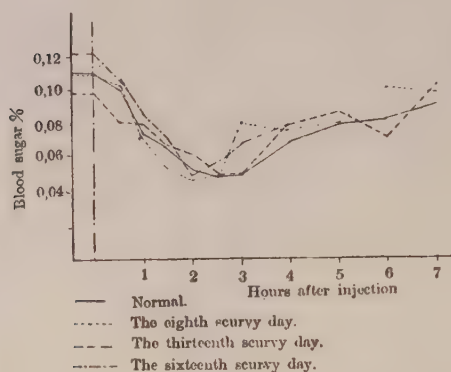
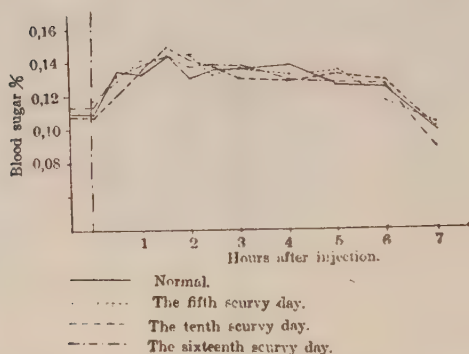


Fig. 4. (Table XVII. Guinea pig no. 4)



As shown in the above tables and in Fig. 4, the blood sugar content rose to the maximum at the second hour after the injection, and returned to normal levels by the seventh hour. There was no difference between the adrenalin effect on the blood sugar content of the normal guinea pigs and that of the scorbutic ones.

The facts above mentioned indicate that the processes of carbohydrate metabolism, such as glycogenesis and glycogenolysis, besides sugar assimilation, in scorbutic guinea pigs do not differ from those in normal ones.

V. CONCLUSIONS.

1. The carbohydrate tolerance of the scorbutic guinea pigs

does not differ from the normal. The disturbance of the tolerance at the end period of the scurvy seems to be due to an inanition.

2. In the effect of insulin on the blood sugar content, there is seen no difference between the normal and the scorbutic guinea pigs.

3. The effect of adrenalin stands also in the same relation to the case of insulin.

4. It is also proved that there is no disturbance of carbohydrate metabolism in the scorbutic guinea pigs.

REFERENCES.

- Collazo, J. A. (1922): *Biochem. Z.*, **134**, 194.
Horiuchi (1923): *Tokyo-Igakkai-Zasshi*, **38**, No. 1.
Koga, Y. (1930): *J. of Biochem.*, **XI**, No. 3.
Nagayama, T., Machida, H. and Takeda, Y. (1928): *J. of Biochem.*, **10**, 17.
Palladin, A. (1924): *Biochem. Z.*, **152**, 228.
Sherman, H. C. and Smith, S. L. (1922): *The vitamin*.
Tomita, K. (1928): *Sei-I-Kwai-Zasshi*, **47**, No. 9.

Additional Writings:

We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expenses of this work, which have been defrayed from Ujun-Kwai.

CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENTSTEHUNG DES NAPHTALIN- KATARAKTS.

VON

TEIJI NAKASHIMA.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
und der I. Chirurgischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. H. Akaiwa)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka.)

(Eingegangen am 7. Oktober 1933)

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung.

I. Bestimmung des Harn-Sulfatgehaltes nach Naphtalin, Naphthalin-Zystin und Naphtalin-Natriumsulfat-Verabreichung.

Bestimmungsmethode.

Untersuchung des Harns.

A. Bestimmung der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach der Naphtalin-Verabreichung.

B. Bestimmung der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin und Zystin.

C. Bestimmung der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin und Natrium sulfuricum.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Weitere Versuche mit veränderter Dosis.

Zusammenfassung.

II. Der Glutathiongehalt der Leber, Augenlinse und des M. gastrocnemius nach der Verabreichung von Naphtalin.

Bestimmungsmethode.

Versuchsergebnisse.

III. Bestimmung der Äther- und anorganischen Schwefelsäure, des Neutralschwefels und der Glukuronsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin.

Bestimmungsmethode.

Eigene Versuchsergebnisse.

IV. Bestimmung der Äther- und anorganischen Schwefelsäure, des Neutralschwefels und der Glukuronsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin bei Pankreasdiabetes.

Bestimmungsmethode.

Eigene Versuchsergebnisse.

Literatur.

EINLEITUNG.

Bouchard und Charrin (1886) und weiter auch Panas (1887) und Dor (1887) haben gefunden, dass als deutliches Merkmal bei der Naphtalinintoxikation im Auge Katarakt und Retinaveränderungen auftreten. Danach haben verschiedene Forscher die Ursache für die Entstehung dieser Erscheinung festzustellen gesucht; Reis (1911), Jess (1913), Goldschmidt (1917), Shoji (1927) und Adams (1930) fanden die Ursache für die Linsentrübung in einem Verschwinden oder einer Verminderung des Zysteingehaltes, Jess (1913) und Goldschmidt (1917) in einer quantitativen Veränderung des Linseneiweisses, Michael und Vancea (1926) und Adams (1930) in einer Zunahme des Blutcholesterin-Gehaltes, Adams (1930) und Kishino (1932) in einer Verminderung des Ca-Gehaltes des Blutes. Adams und Kerridge (1930) hielten es für möglich, dass die Entstehung des Katarakts auf Veränderungen im PH des Kammerwassers zurückzuführen sei, dann haben auch Michael und Vancea (1926) die Lösung dieser Frage mit Funktionsstörungen der Nebenniere, Schilddrüse und Nebenschilddrüse und Kishino (1932) nur mit solchen der Nebenschilddrüse zu erklären versucht. Jedenfalls ist diese Frage bisher biochemisch ebensowenig wie ophthalmologisch vollständig einwandfrei gelöst worden, und es harren hierüber noch viele Einzelfragen ihrer Beantwortung.

Wie Tsuji (1932) in unserem Laboratorium bereits festgestellt hat, stellt sich bei dem experimentellen Naphtalinkatarakt eine deutliche Verminderung der Zysteinmenge in der Linse ein. Daraus entsteht für uns die Frage, ob sich nicht vielleicht das Zystein mit dem Naphtalin verbindet und aus dem Körper ausgeschieden wird, und so die Verminderung des Zysteins herbeigeführt wird, als deren Folge Veränderungen in dem Eiweissgehalt der Linse und der Permeabilität der Linsenkapsel eintreten, durch die schliesslich der Katarakt entsteht. Es besteht weiterhin auch die Möglichkeit,

dass sich das Naphtalin im Körper mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure verbindet, so in einen löslichen Zustand übergeht und durch Präzipitation des Linseneiweisses die Entstehung des Katarakts bewirkt.

Verf. hat sich hauptsächlich mit Untersuchungen bezügl. der Zysteinfrage befasst, d. h. peroral an Kaninchen Naphtalin verabreicht und die darauf folgenden Veränderungen in dem Sulfatgehalt des Harns bestimmt.

I. BESTIMMUNG DES HARN-SULFATGEHALTES NACH NAPHTALIN-,
NAPHTALIN-ZYSTIN UND NAPHTALIN-NATRIUMSULFAT-
VERABREICHUNG.

Penzoldt (1886) fand, dass nach Naphtalinverfütterung der Harn dunkel gefärbt war und sich bei Hinzufügung von konz. Schwefelsäure dunkelgrün verfärbte. Er nahm an, dass das verabreichte Naphtalin in Form von α - und β -Naphtachinon aus dem Körper ausgeschieden wird.

Lesnik und Nencki (1889) berichteten, dass das Naphtalin im Tierkörper zu α -Naphtol und Dioxynaphtalin oxydiert wird, und dass letzteres zum Teil als Ätherschwefelsäure und zum Teil als Glukuronsäureverbindung ausgeschieden wird.

Igerscheimer und Ruben (1910) fanden, dass das Naphtalin als α -Naphtol ausgeschieden wird, und Adams (1930) wiederum behauptete, dass es hauptsächlich als α -Naphtol und α - und β -Naphtolglukuronsäure ausgeschieden würde.

Im Harn erscheint der Schwefel in drei Formen: als sogenannter Neutralschwefel nicht ionisierbarer Bindung, also als S-haltige organische Sulfoverbindungen, weiter auch als Schwefelsäureester und schliesslich als Schwefelsäureion.

Bestimmungsmethode.

Gravimetrische Bestimmung der Schwefelsäuren nach Folin.

a) *Bestimmung der anorganischen Schwefelsäure:* 25 cem Harn werden in einem 200–250 cem-Erlenmeyerkolben mit 100 cem Aqua dest. und 20 cem verd. HCl(1:4) versetzt. Hierzu werden 10–15 cem 5%ige Bariumchloridlösung tropfenweise hinzugegeben,

ohne dass der Inhalt des Kolbens umgerührt oder geschüttelt wird. Erst 10–30 Min. nach der Fällung wird der Kolbeninhalt durchgemischt; er bleibt mindestens 1 Stunde stehen. Dann wird durch Filterpapier (Schleicher & Schüll No. 590) filtriert, der Niederschlag mit ca. 250 ccm kaltem Wasser gewaschen, getrocknet und gegläht. Nach dem Abkühlen wird der Tiegel gewogen.

b) Bestimmung der Ätherschwefelsäure. Die Ätherschwefelsäure kann direkt bestimmt werden, indem man 25 ccm Harn mit 100 ccm Aqua dest. und 20 ccm verd. $\text{HCl}(1:4)$ versetzt, die Mischung mit 20 ccm einer 5%igen Bariumchloridlösung tropfenweise (wie unter **a** beschrieben) fällt, nach 1 Stunde das abgeschiedene Sulfat abfiltriert und das Filtrat mindestens 30 Min. lang kocht. Die aus den Ätherschwefelsäuren abgespaltene Schwefelsäure fällt als Bariumsulfat aus und wird, wie oben angegeben, filtriert, gegläht und gewogen.

Untersuchung des Harns.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen, die im Stoffwechselkorb gehalten wurden, sodass der Harn gänzlich ohne Verlust gesammelt werden konnte. Vor der Untersuchung wurde der Harn einmal mittels des Nelatonkatheters völlig entleert; dann wurde 24 Stunden nach völliger Entleerung der Harnblase die Harnuntersuchung vorgenommen. Dann wurde während 3 Tagen der normale Harn untersucht, und danach wurden nach der Methode von Adams am 3. Tage nach der Harnentnahme 3–5 g Naphtalin, in einigen Fällen auch 8.0 g Naphtalin mit 2–4 g Traubenzucker vermischt mit flüssigem Paraffin in einer Gelatinkapsel verabfolgt. Vom folgenden Tage ab wurde dann während 7–9 Tagen die Harnuntersuchung vorgenommen.

Die Naphtalinvergiftungs-Erscheinungen waren sehr schwer. Als Augenveränderungen traten mehr oder weniger schwere Iritis, Retinitis und auch Katarakt auf, nur selten waren die Augen ganz unverändert. Ausser den Augenveränderungen fanden sich hauptsächlich Darmkatarrh und Diarrhoe. Bei schlechtem Appetit magern die Tiere stark ab und gehen dann schliesslich ein. Am Tage nach der Naphtalin-Verabreichung wird der Harn schwärz-

lich-braun, dunkelbraun und braun-milchig; dann erhält er aber mit der Zeit wieder seine normale Farbe.

A. Bestimmung der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach der Naphtalin-Verabreichung.

Baumann und Herter (1887) haben an 2 Hunde je 5.0 g reines Naphtalin in Form von Emulsion verabreicht und gefunden, dass am Tage nach der Verabreichung die Ratio der anorganischen und der Ätherschwefelsäure auf 0.3 (bei normalen Hunden nach Fleischkost 37.4–6.5 und nach gemischter Kost 53.5–24.4) vermindert wurde.

Verf. hat seine Versuche nach der Methode von Adams, wie oben beschrieben, ausgeführt und die Ergebnisse in der Tabelle I und der Kurve 1 zusammengestellt.

B. Bestimmung der Äther- und anorganischen Schwefelsäure nach Verabreichung von Naphtalin und Zystin.

Denis und Reed (1927) haben an Kaninchen 0.5 g gepulverten Schwefel pro kg Körpergewicht verabreicht und dabei beobachtet, dass darauf die Schwefelausscheidung im Harn stark zunahm, und zwar betrug diese 10% der zugeführten Schwefelmenge. Stearns und Lewis (1930) fanden, dass nach Verabreichung von Zystin dieses ausserordentlich rasch oxydiert wird, und dass 60–85% des Zystinschwefels innerhalb 24 Stunden als anorganisches Sulfat ausgeschieden werden. Büttner (1930) verabreichte den Tieren 2.0 g Zystin und fand, dass die Sulfatschwefel- und Neutralschwefel-Menge im Harn stark zunahm, und zwar 70% des Sulfatschwefels und 30% des Neutralschwefels ausgeschieden wurden.

Verf. hat an Kaninchen 5.0 g Naphtalin, 3.0 g Traubenzucker und als organische Schwefelsäure Zystin in einer Menge von 2.0 g verabreicht. Die Ergebnisse seiner Versuche fasst der Verf. in der Tabelle II und Kurve 2 zusammen.

C. Bestimmung der Äther- und anorganischen Schwefelsäure im Harn nach Verabreichung von Naphtalin und Natrium sulfuricum.

In Tabelle III und Kurve 3 hat der Verf. die Ergebnisse seiner Versuche mit der Verabreichung von 5.0g Naphtalin, 3.0g Traubenzucker und 2.0g Natrium sulfuricum als anorganische Schwefelverbindung niedergelegt.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

A. Bestimmung der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach der Naphtalin-Verabreichung.

Es bestehen Schwankungen in dem Gehalt an Äther- und anorganischer Schwefelsäure im Harn, und zwar solche individueller ebenso wie auch zeitlicher Art, doch sind diese nicht sehr gross im Vergleich zu dem Normalwert. Die Ätherschwefelsäure (Tabelle I und Kurve 1) nimmt am 1. Tage nach der Naphtalin-

TABELLE I.

Durchschnittswerte der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach Naphtalin-Verabreichung (Durchschnitt von 5 Fällen).

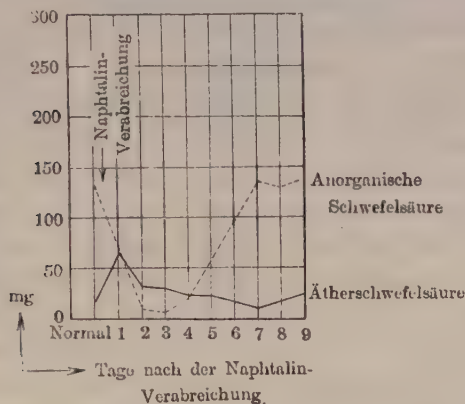
Tage nach der Naphtalin-Verabreichung	Äther-schwefelsäure (mg)	Anorganische Schwefelsäure (mg)
Normal	14,82	141,59
1. Tag.	69,28	70,51
2. T.	31,05	10,75
3. T.	29,49	4,61
4. T.	22,87	20,05
5. T.	22,46	52,75
6. T.	17,52	91,60
7. T.	13,20	137,85
8. T.	17,60	129,40
9. T.	23,86	137,20

Bemerkungen.

5 Fälle { Linsentrübung 4.
Retinitis 1.

Kurve 1.

Kurve der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach der Naphtalin-Verabreichung.



verfütterung um ca. das 5fache des Normalwerts zu und kehrt dann innerhalb einer Woche zum Normalwert zurück. Die anorganische Schwefelsäure dagegen nimmt am 1. Tage nach der Naphtalinverabreichung um ca. 50% des Normalwerts ab und erreicht am 3. Tage einen Minimalwert, worauf dann innerhalb einer Woche Rückkehr zur Norm eintritt. Bezüglich der Augenveränderungen ist aus der Tabelle zu ersehen, dass in 4 unter 5 Fällen sich Linsentrübung und in einem Falle Retinitis fanden.

B. Bestimmung der Äther- und anorganischen Schwefelsäure nach Verabreichung von Naphtalin und Zystin.

Am 1. Tage nach der Naphtalin- und Zystin-Verabreichung nimmt auch hier die Ätherschwefelsäure (Tabelle II und Kurve 2) um das 5fache des Normalwerts zu, dann wieder allmählich ab und erreicht nach 5–6 Tagen wieder den Normalwert. Die anorganische Schwefelsäure nimmt am 1. Tage nach der Verabreichung des Naphtalins und Zystins plötzlich um ca. das 2,5fache des Normalwerts zu, am 2. Tage dann wieder plötzlich auf die Hälfte des normalen Wertes ab; am 3. Tage wird mit ca. $\frac{1}{6}$ des Normalwerts das Minimum erreicht, und dann findet eine allmähliche Rückkehr zur Norm statt, die innerhalb einer Woche erreicht wird.

TABELLE II.

Durchschnittswerte der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn
nach der Verabreichung von Naphtalin und Zystin.
(Durchschnitt von 9 Fällen.)

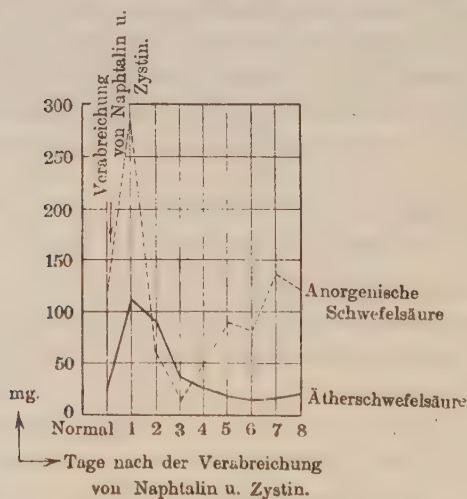
Tage nach der Verabreichung von Naphtalin und Zystin	Äther- schwefelsäure (mg)	Anorganische Schwefelsäure (mg)
Normal	20,77	119,87
1. T.	113,66	290,94
2. T.	91,90	56,42
3. T.	34,42	18,44
4. T.	25,74	49,61
5. T.	19,83	95,61
6. T.	16,49	80,49
7. T.	16,83	136,79
8. T.	18,18	122,46

Bemerkungen.

9 Fälle { Linsentrübung 2.
Retinitis 2.
Linse und Retina intakt 5.

Kurve 2.

Kurve der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn
nach der Verabreichung von Naphtalin und Zystin.



Wie aus der Tabelle II weiter zu ersehen ist, finden sich als Augenveränderungen unter 9 Fällen in 2 Fällen Linsentrübung (ca. 20%), in 2 Fällen Retinitis; in 5 Fällen waren Linse ebenso

wie Retina völlig intakt.

*C. Bestimmung der Äther- und anorganischen Schwefelsäure
im Harn nach Verabreichung von Naphtalin und
Natrium sulfuricum.*

Die Ätherschwefelsäure (Tabelle III und Kurve 3) nimmt nach der Naphtalin- und Natrium sulfuricum-Verabreichung um ca. das 6fache des Normalwerts zu, dann allmählich wieder ab und erreicht schliesslich nach 5–6 Tagen wieder die Norm, gerade so wie es auch in den beiden vorhergehenden Versuchen der Fall war. Die anorganische Schwefelsäure nimmt am 1. Tage um das 3fache des Normalwerts zu, dann sinkt der Gehalt am 2. Tage bis auf die Hälfte und am 3. Tage auf das Minimum von 1/7 des Normalwerts ab, wonach dann innerhalb 1 Woche allmähliche Rückkehr zur Norm stattfindet. Als Augenveränderungen fanden sich, wie aus der Tabelle III hervorgeht, in 3 unter 9 Fällen (33%) Linsentrübung und Retinitis in 5 Fällen; nur in einem Falle waren Linse

TABELLE III.

Durchschnittswerte der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn
nach der Verabreichung von Naphtalin und Natrium sulfuricum.
(Durchschnitt von 9 Fällen.)

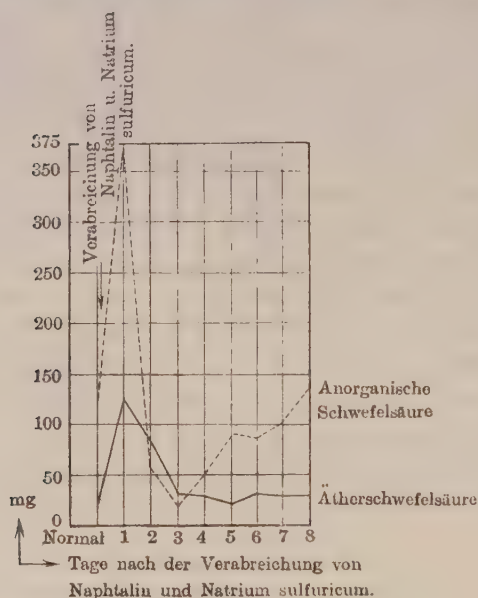
Tage nach der Verabreichung von Naphtalin und Natrium Sulfuricum	Äther- schwefelsäure (mg)	Anorganische Schwefelsäure (mg)
Normal	21,45	121,80
1. T.	126,41	373,70
2. T.	80,71	55,35
3. T.	31,40	18,69
4. T.	29,20	47,32
5. T.	21,81	91,23
6. T.	31,02	87,21
7. T.	28,29	102,41
8. T.	29,44	141,87

Bemerkungen.

9 Fälle { Linsentrübung 3.
Retinitis 5.
Linse und Retina intakt 1.

Kurve 3.

Kurve der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin und Natrium sulfuricum.



und Retina völlig intakt.

Weitere Versuche mit veränderter Dosis.

Verf. hat dann weiter 10 Kaninchen in 2 Gruppen eingeteilt. Die eine (Tabelle IV) erhielt täglich pro kg Körpergewicht 1.28 g Naphtalin, und die andere (Tabelle IVa) 1.28 g Naphtalin und 1.21 g Zystin täglich während einer Woche. Die Beobachtung der Augenveränderungen in der ersten Gruppe ergab, dass in 4 von 5 Fällen (80%) Linsentrübung und in 1 Fall Retinitis auftraten; ein Fall ging vorzeitig ein. In der 2. Gruppe trat nur bei einem unter 5 Fällen Linsentrübung auf, während bei den restlichen 4 Fällen Linse und Retina intakt waren. Merkwürdigerweise gingen am 6. Tage alle 5 Tiere ein. Darauf habe ich an weitere 4 Kaninchen (Tabelle IVb) täglich 1.21 g Zystin pro kg Körpergewicht verabreicht und gefunden, dass die Tiere ohne irgendwelche Augen-

TABELLE IV.

Täglich Naphtalin 1.28 g pro kg Körpergewicht, Traubenzucker
3,0 g während 1 Woche gegeben.

5 Fälle { Linsentrübung 4.
Retinitis 5.
Exitus 1.

No.	Beobach- tungstage	Iritis	Linsen- trübung	Retinitis	Diarrhoe	Bemerkungen
1. ♀ Weiss 2643 g	1. T.	+	—	—	—	n.b.
	2. T.	++	—	—	—	
	3. T.	+++	—	—	—	
	4. T.	+++	—	—	—	
	5. T.	++	—	—	—	
	6. T.	++	±	+	—	
	7. T.	++	+	+	—	
	8. T.	++	+	+	—	
2. ♀ Weiss 2473 g	1. T.	+	—	—	—	n.b.
	2. T.	+	—	—	+	
	3. T.	+	—	—	+	
	4. T.	+	—	—	—	
	5. T.	++	—	—	—	
	6. T.	+	±	—	—	
	7. T.	+	+	+	—	
	8. T.	+	+	+	—	
3. ♀ Weiss 2446 g	1. T.	+	—	—	+	n.b.
	2. T.	+	—	—	+	
	3. T.	+	—	—	—	
	4. T.	+	—	—	—	
	5. T.	+	—	+	—	
	6. T.	+	±	+	—	
	7. T.	+	+	+	—	
	8. T.	+	+	+	—	
4. ♀ Weiss 2886 g	1. T.	+	—	—	+	Exitus
	2. T.	++	—	+	+	
	3. T.	+++	—	+	+++	
	4. T.	+++	—	+	+++	
	5. T.	+++	±	+	+++	
	6. T.	+++	+	+	+++	
	7. T.	+++	+	+	+++	
	8. T.	+	—	—	—	
5. ♀ Weiss 2700 g	1. T.	—	—	—	—	n.b.
	2. T.	—	—	—	—	
	3. T.	—	—	—	—	
	4. T.	—	—	—	—	
	5. T.	—	—	—	—	
	6. T.	—	—	—	—	
	7. T.	+	—	+	—	
	8. T.	+	—	+	—	

TABELLE IV a.

Täglich Naphtalin 1,28 g, Zystin 1,21 g pro kg Körpergewicht und
Traubenzucker 3,0 g während 1 Woche gegeben.

5 Fälle { Linsentrübung 1.
Exitus 5.

No.	Beobach- tungstage	Iritis	Linsen- trübung	Retinitis	Diarrhoe	Bemerkungen
1. ♀ Weiss 2855 g	1. T.	—	—	—	—	Exitus
	2. T.	+	—	—	—	
	3. T.	+	—	—	—	
	4. T.	+	—	—	—	
	5. T.	+	—	—	—	
	6. T.					
2. ♀ Weiss 2432 g	1. T.	—	—	—	—	Exitus
	2. T.	—	—	—	—	
	3. T.	—	—	—	—	
	4. T.	—	—	—	—	
	5. T.	+	—	—	—	
	6. T.					
3. ♀ Weiss 2405 g	1. T.	—	—	—	—	Exitus
	2. T.	+	—	—	—	
	3. T.	+	—	—	—	
	4. T.	+	—	—	—	
	5. T.	+	±	—	—	
	6. T.					
4. ♀ Weiss 2492 g	1. T.	—	—	—	—	Exitus
	2. T.	+	—	—	—	
	3. T.	+	—	—	—	
	4. T.	+	—	—	—	
	5. T.	+	—	—	—	
	6. T.					
5. ♀ Weiss 2273 g	1. T.	—	—	—	—	Exitus
	2. T.	+	—	—	—	
	3. T.	+	—	—	+	
	4. T.	+	—	—	+	
	5. T.	+	—	—	+	
	6. T.					

TABELLE IV b.

Nur Zystin täglich 1.21 g pro kg Körpergewicht während 1 Woche gegeben.

4 Fälle { Augenveränderungen 0.
Exitus 3.

No.	Beobach- tungstage	Augen- veränderungen	Diarrhoe	Bemerkungen
1. ♀ Weiss 2652 g	1. T. 2. T. 3. T. 4. T. 5. T.	— — — — —	— — — — —	Exitus
2. ♀ Weiss 2261 g	2. T. 4. T. 5. T. 6. T.	— — — —	— — — —	Exitus
3. ♀ Weiss 2566 g	2. T. 4. T. 5. T. 6. T. 7. T.	— — — — —	— — — — —	Exitus
4. ♀ Weiss 2920 g	2. T. 4. T. 6. T. 8. T. 10. T.	— — — — —	— — — — —	n.b.

TABELLE IV c.

Nur Zystin täglich 1.21 g pro kg Körpergewicht während 1 Woche gegeben.

3 Fälle { Augenveränderungen 0.
Exitus 0.

No.	Beobach- tungstage	Augen- veränderungen	Diarrhoe	Bemerkungen
1. ♀ Weiss 2100 g	5. T. 10. T. 15. T. 20. T. 25. T.	— — — — —	— — — — —	n.b.
2. ♀ Weiss 2212 g	5. T. 10. T. 15. T. 20. T. 25. T.	— — — — —	— — — — —	n.b.
3. ♀ Weiss 2385 g	5. T. 10. T. 15. T. 20. T. 25. T.	— — — — —	— — — — —	n.b.

veränderungen sämtlich innerhalb 5–7 Tagen eingingen. Bei Verabreichung von nur 0.5 g pro kg Körpergewicht während 3 Wochen überlebten die Tiere den Versuch, und es waren keinerlei Augenveränderungen zu beobachten (Tabelle IVc). Weiter habe ich dann an 3 Tiere (Tabelle V) täglich während 3 Wochen 0.5 g Naphtalin und 0.5 g Zystin verabreicht. Bei diesem Versuche starb ein Tier nach 8 Tagen, die anderen beiden Tiere waren nach 3 Wochen noch gesund, und auch die Linse und die Retina waren gänzlich intakt.

Bei weiteren Versuchen mit der Verabreichung von nur 0.5 g Naphtalin täglich während drei Wochen (Tabelle Va) wurden in einem Falle Linsentrübung und in einem Falle Retinitis beobachtet; 2 Fälle waren frei von jeglichen Augenveränderungen.

Bei Verabreichung von 1.0 g Naphtalin täglich an 5 Kaninchen (Tabelle Vb) während drei Wochen wurde in 3 Fällen Linsentrübung, in 4 Fällen Retinitis beobachtet; in 1 Falle trat heftige Diarrhoe auf, und das Tier magerte allmählich ab, erholte sich aber allmählich wieder zu Ende des Versuches.

Schliesslich habe ich dann an 5 Tiere (Tabelle Vc) täglich 1.0 g Naphtalin und 0.5 g Zystin verabfolgt, und zwar während drei Wochen. Hierbei kam keine Linsentrübung zur Beobachtung, und nur in 1 Falle Retinitis. Ein Tier ging nach heftiger Diarrhoe und starker Abmagerung nach 16 Tagen ein, bei den übrigen waren Linse und Retina völlig intakt.

Zusammenfassung.

Wenn wir nun die Ergebnisse aller dieser Versuche zusammenfassen, so zeigt sich, dass in den Versuchsreihen A, B und C bei Naphtalin-, Naphtalin und Zystin- und auch bei Naphtalin- und Natrium sulfuricum-Verabreichung am ersten Tage nach der Verabreichung der Ätherschwefelsäuregehalt des Harns um das 5–6fache zunimmt, dann allmählich abnimmt und nach einer Woche den Normalwert wieder erreicht, was vielleicht darauf zurückzuführen sein wird, dass das Naphtalin sich im Körper mit Körpern der Zysteingruppe verbindet und dann als ungiftige Ätherschwefelsäure ausgeschieden wird.

TABELLE V.

Täglich Naphtalin 0,5 g und Zystin 0,5 g während 3 Wochen gegeben.

3 Fälle { Linsentrübung 0.
Retinitis 0.
Exitus 1.

No.	Beobachtungstage	Iritis	Linsentrübung	Retinitis	Diarrhoe	Bemerkungen
1. ♀ Weiss 2295 g	2. T.	—	—	—	—	n.b.
	4. T.	—	—	—	—	
	6. T.	—	—	—	—	
	8. T.	—	—	—	—	
	10. T.	—	—	—	—	
	12. T.	—	—	—	—	
	14. T.	—	—	—	—	
	16. T.	—	—	—	—	
	18. T.	—	—	—	—	
	20. T.	—	—	—	—	
	22. T.	—	—	—	—	
	24. T.	—	—	—	—	
2. ♀ Weiss 2203 g	2. T.	—	—	—	—	Exitus
	4. T.	—	—	—	—	
	6. T.	—	—	—	—	
	8. T.	—	—	—	—	
3. ♀ Weiss 2330 g	2. T.	—	—	—	—	n.b.
	4. T.	—	—	—	—	
	6. T.	—	—	—	—	
	8. T.	—	—	—	—	
	10. T.	—	—	—	—	
	12. T.	—	—	—	—	
	14. T.	+	—	—	—	
	16. T.	+	—	—	—	
	18. T.	+	—	—	—	
	20. T.	+	—	—	—	
	22. T.	+	—	—	—	
	24. T.	+	—	—	—	

TABELLE V a.

Naphtalin 0,5 g täglich während 3 Wochen gegeben.

 5 Fälle {

Linsentrübung	1.
Retinitis	1.
Linse und Retina intakt	3.

No.	Beobachtungstage	Iritis	Linsentrübung	Retinitis	Diarrhoe	Bemerkungen
1.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♀	10. T.	—	—	—	—	
	15. T.	—	—	—	—	
Weiss	20. T.	—	—	—	—	
2277 g	24. T.	—	—	—	—	
	27. T.	—	—	—	—	
2.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♀	10. T.	—	—	—	—	
	15. T.	—	—	—	—	
Weiss	20. T.	+	—	—	—	
2140 g	24. T.	+	+	—	—	
	27. T.	+	+	—	—	
3.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♂	10. T.	—	—	—	—	
Weiss	15. T.	—	—	—	—	
	20. T.	—	—	—	—	
2510 g	24. T.	—	—	—	—	
	27. T.	—	—	—	—	
4.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♀	10. T.	—	—	—	—	
Weiss	15. T.	—	—	—	—	
2838 g	20. T.	—	—	—	—	
	24. T.	+	—	—	—	
	27. T.	+	—	—	—	
5.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♀	10. T.	—	—	—	—	
	15. T.	—	—	—	—	
Weiss	20. T.	+	—	+	—	
	24. T.	+	—	+	—	
2255 g	27. T.	+	—	+	—	

TABELLE V b.

Naphtalin 1,0 g täglich während 3 Wochen gegeben.

5 Fälle { Linsentrübung 3.
 Retinitis 4.
 Linse und Retina intakt 1.

No.	Beobachtungstage	Iritis	Retinitis	Linsentrübung	Diarrhoe	Bemerkungen
1.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♀	10. T.	+	—	—	—	
Weiss	15. T.	+	+	—	—	
	20. T.	+	+	—	+	
2640 g	24. T.	+	+	—	+	
	27. T.	+	+	—	—	
2.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♀	10. T.	+	—	—	—	
Weiss	15. T.	+	+	+	—	
	20. T.	+	+	+	—	
2358 g	24. T.	+	+	+	—	
	27. T.	+	+	+	—	
3.	5. T.	—	—	—	—	abgemagert " sehr abgemagert "
♀	10. T.	+	—	—	+	
	15. T.	+	+	—	+	
Weiss	20. T.	+	+	+	+	
2130 g	24. T.	+	+	+	+	
	27. T.	+	+	+	+	
4.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
	10. T.	—	—	—	—	
♂	15. T.	+	—	—	—	
Weiss	20. T.	+	—	—	—	
2405 g	24. T.	+	—	—	—	
	27. T.	+	—	—	—	
5.	5. T.	—	—	—	—	n.b.
♀	10. T.	+	—	—	—	
Weiss	15. T.	+	+	—	—	
	20. T.	+	+	+	+	
2475 g	24. T.	+	+	+	+	
	27. T.	+	+	+	—	

TABELLE V c.

Naphtalin 1,0 g und Zystin 0,5 g täglich während 3 Wochen gegeben.

5 Fälle { Linsentrübung 0.
 Retinitis 1.
 Linse und Retina intakt 4.
 Exitus 1.

No.	Beobach- tungstage	Iritis	Retinitis	Linsen- trübung	Diarrhoe	Bemerkungen
1	5. T.	—	—	—	—	
♀	10. T.	—	—	—	+	abgemagert
Weiss	15. T.	+	—	—	+	sehr abgemagert
	20. T.					am 16. Tage.
2255 g	24. T.					Exitus
2	5. T.	—	—	—	—	
♀	10. T.	—	—	—	—	
Weiss	15. T.	+	—	—	—	
	20. T.	+	—	—	+	
2262 g	24. T.	+	—	—	—	n.b.
3	5. T.	—	—	—	—	
♀	10. T.	—	—	—	—	
Weiss	15. T.	—	—	—	—	
	20. T.	+	—	—	—	
2540 g	24. T.	+	—	—	—	n.b.
4	5. T.	—	—	—	—	
♂	10. T.	—	—	—	—	
Weiss	15. T.	—	—	—	—	
	20. T.	—	—	—	—	
2385 g	24. T.	—	—	—	—	n.b.
5	5. T.	—	—	—	—	
♀	10. T.	+	—	—	—	
Weiss	15. T.	+	+	—	—	
	20. T.	+	+	—	+	
2337 g	24. T.	+	+	—	+	n.b.

Die anorganische Schwefelsäure wird am ersten Tage nach der Verabreichung des Naphtalins um 50% des Normalwertes vermindert, dagegen bei Verabreichung von Naphtalin mit Zystin oder Naphtalin mit Natrium sulfuricum um das 2.5–3fache des Normalwertes vermehrt, danach wiederum am 3. Tage bis auf einen Minimalwert vermindert, um dann nach 5–7 Tagen wieder zur Norm zurückzukehren, wie das in allen 3 Versuchsreihen der Fall war. Die am ersten Tage in den beiden Versuchsreihen B und C beobachtete Zunahme ist sicherlich, wie das schon von Denis und Reed, sowie Stearns und Lewis betont worden ist, auf die Ausscheidung des Zystins oder des Natrium sulfuricum als anorganische Schwefelsäure zurückzuführen.

Bezüglich der Linsentrübung zeigt es sich, dass von dieser in der Versuchsreihe mit Verabreichung von nur Naphtalin die meisten Fälle beobachtet wurden, d. h. in der Versuchsreihe A in 80% der Fälle. In der 2. Versuchsreihe, bei Verabreichung von Naphtalin und Zystin, finden sich die wenigsten Fälle von Linsentrübung (20%), in der Mitte dazwischen liegen der Anzahl nach die Fälle von Linsentrübung bei Verabreichung von Naphtalin und Natrium sulfuricum (33%). Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch die Verabreichung von Zystin das durch die Ätherschwefelsäure-Bildung verbrauchte Körperzystein ersetzt wird. Das überschüssige Zystin müsste eigentlich auf den Organismus giftig wirken; da es sich aber nur um kleine Mengen handelt, tritt diese Giftwirkung nicht hervor.

II. DER GLUTATHIONGEHALT DER LEBER, AUGENLINSE UND DES M. GASTROCNEMIUS NACH DER VERABREICHUNG VON NAPHTALIN.

Seit Arnold (1910) die Zysteinreaktion der Augenlinse stark positiv fand, hat man bei Forschungen über die Entstehung des Katarakts auf den Zysteingehalt der Augenlinse besonders hohen Wert gelegt. Reis (1912) hat gefunden, dass in der Altersstarlinse die Zysteinreaktion negativ ausfällt, Jess (1913), Goldschmidt (1917), Seki (1926), Shoji (1927), und Cohen, Kammer und Killian (1928) haben diese Angabe nachgeprüft

und bestätigt gefunden.

Tassmann (1929) und Shoji (1931) haben bei der Altersstarlinse, und Adams (1930) bei der Naphtalinkataraktlinse das quantitative Verschwinden des Zysteins festgestellt, und Goldschmidt (1924) fand, dass bei Katarakt auch das Glutathion aus der Linse verschwindet.

Verf. hat nun bei Kaninchen nach Naphtalin-Verabreichung den Glutathiongehalt derjenigen Körperteile, deren Glutathiongehalt ein relativ hoher ist, d. h. der Leber, der Augenlinse und des M. gastrocnemius quantitativ bestimmt und ist dabei zu den nachstehenden Resultaten gekommen.

Bestimmungsmethode. Zu meinen Versuchen habe ich Kaninchen verwendet. Nach der Methode von Adams habe ich den Kaninchen 5.0 g Naphtalin und 2–4,0 g Traubenzucker mit einer kleinen Menge flüssigen Paraffins eingegeben. Ich verwendete zuerst einige Kaninchen ohne Katarakt, die je an einem der ersten sieben Tage nach der Verabreichung von Naphtalin und Traubenzucker zur Glutathionbestimmung getötet und untersucht wurden, und zur Kontrolle gesunde Kaninchen.

Die durch Dekapitation entbluteten Tiere wurden sofort seziiert; je 1.0 g von Leber und M. gastrocnemius und die beiderseitige Augenlinse wurden ausgewogen und je in einer Reibschale mit feinem Seesand zerrieben; dann fügte ich 5 ccm N/2 Sulfo-salizylsäure hinzu, zerrieb wieder mehrmals genügend, liess einige Minuten lang stehen und brachte dann die obere klare Schicht des Extraktes in eine neue Schüssel ein. Der Rückstand in der Reibschale wurde dann noch dreimal mit 5.0 ccm N/2 Sulfosalizylsäurelösung zerrieben und ausgewaschen. Von dem gewonnenen Extrakt wurden 20.0 ccm durch Filterpapier filtriert, und ein aliquoter Teil der Filtrats abpipettiert. Dann wurde die reduzierte Form des Glutathions nach der potentiometrischen Titrationsmethode von Yamazaki (1930) bestimmt. Die oxydierte Form des Glutathions wurde in der Weise bestimmt, dass ein Teil des Filtrats mit einer kleinen Menge Zinkpulver versetzt 10 Minuten lang bei 70–80°C im Wasserbade erwärmt wurde. Nach der vollständigen Reduktion erfolgte dann die Bestimmung nach der

Methode von Yamazaki, d.h. zu 2,0 ccm des Filtrats wurden 3,0 ccm N/2 Sulfosalizylsäure, 1,0 ccm M/10 Kaliumjodid und 1,0 ccm Norm-Sulfosalizylsäure in eine Flasche hineinpipettiert; sodann wurde im Thermostaten bei 20°C mit M/2000 Kaliumjodat in N/2 Sulfosalizylsäurelösung titriert. Andererseits wurde unter denselben Bedingungen der Menge, Acidität und Temperatur eine Standardzysteinlösung mit derselben Kaliumjodatlösung titriert in die betreffenden Werte umgesetzt, und diese als die Glutathionmenge des Gewebes angenommen.

Versuchsergebnisse. Wie die Tabelle VI und die Kurve 4 zeigen, beträgt der Gehalt an red. Glutathion der Leber (als Zystein berechnet) bei gesunden Kaninchen 92,88 mg%. Am 1. Tage nach der Naphtalinverabreichung wird dieser Wert rasch auf ca. $\frac{1}{6}$ vermindert, am 2. Tage steigt er dann auf $\frac{2}{9}$ und am 3. Tage auf $\frac{2}{7}$ des normalen Wertes auf. Am 4. Tage steigt er dann plötzlich über die Norm auf, und zwar um 30% des normalen Wertes; dann tritt eine allmähliche Rückkehr zu dem normalen Werte ein.

Das oxydierte Glutathion der Leber (als Zystin berechnet) beträgt bei gesunden Kaninchen 7,12 mg%, also nicht mehr als 7% des normalen reduzierten Glutathions. Die Verhältnisse nach der Naphtalinverabreichung entsprechen im Ganzen denen bei dem reduzierten Glutathion beobachteten.

Der Gehalt der Augenlinse an reduziertem Glutathion beträgt bei gesunden Kaninchen 92,45 mg%. Nach der Naphtalinverabreichung nimmt dieser Gehalt am 1. Tage um ca. die Hälfte ab und erreicht dann im Verlaufe der Zeit allmählich wieder den Normalwert. Der Gehalt der Augenlinse an oxydiertem Glutathion ist bei normalen Tieren gleich Null. Am ersten Tage nach der Naphtalinverabreichung beträgt dieser Gehalt 13,08 mg% und am zweiten Tage 12,65 mg%; nach 5–7 Tagen verschwindet er aber wieder.

Der Gehalt des *M. gastrocnemius* an red. Glutathion beträgt bei normalen Kaninchen 6,94 mg%. Am ersten Tage nach der Verabreichung von Naphtalin besteht Neigung zur Abnahme, danach treten Schwankungen auf, doch sind diese nicht von grosser

TABELLE VI.

Der Glutathiongehalt der Leber, der Augenlinse und des M. gastrocnemius ohne Katarakt (als Zystein oder Zystin berechnet).

Tage nach der Naphtalin- Verabreichung	Leber (mg%)		Augenlinse (mg%)		M. gastrocnemius (mg%)	
	reduzierte Form	oxydierte Form	red. F.	oxy. F.	red. F.	oxy. F.
Kontrolle	92,88	7,12	92,45	0	6,94	0
1. T.	15,52	4,29	48,33	13,08	6,31	0,25
2. T.	20,94	4,35	63,33	12,65	7,56	0,25
3. T.	27,50	3,09	68,74	5,50	6,33	0,20
4. T.	133,80	12,98	61,04	4,18	9,93	0
5. T.	109,75	5,73	67,10	0	7,20	0
6. T.	105,62	7,71	76,04	1,25	9,46	0,17
7. T.	104,79	4,38	75,96	0	8,28	0

TABELLE VII.

Der Glutathiongehalt der Leber, der Augenlinse und des M. gastrocnemius beim Katarakt (als Zystein oder Zystin berechnet).

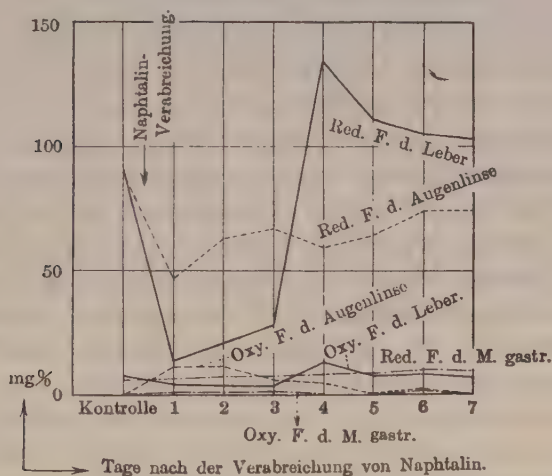
No.	Tage nach der Naphtalin- Verabreichung	Leber (mg%)		Augenlinse (mg%)		M. gastrocnemius (mg%)	
		red. F.	oxy. F.	red. F.	oxy. F.	red. F.	oxy. F.
Kontrolle		92,88	7,12	92,45	0	6,94	0
1. ♀ Weiss 2160 g	106. T.	92,66	3,20	0	0	6,27	0
2. ♀ Weiss 2550 g	120. T.	92,66	15,34	0	0	5,93	0
3. ♀ Schwarz 2570 g	178. T.	83,23	10,77	18,31	4,69	5,21	0

Bedeutung. Bei normalen Kaninchen ist der Gehalt des genannten Muskels an oxydiertem Glutathion gleich Null, am ersten Tage nach der Naphtalinverabreichung beträgt er 0,25 mg% und verschwindet am 4. Tage wieder.

Verf. hat bei 3 Kaninchen mit experimentellem Naphtalin-katarakt den Glutathiongehalt untersucht (Tabelle VII) und ist

Kurve 4.

Kurve des Glutathiongehalts der Leber, der Augenlinse und des M. gastrocnemius nach der Verabreichung von Naphtalin (als Zystein oder Zystin berechnet).



dabei zu sehr interessanten Ergebnissen gekommen. Hier wurde festgestellt, dass der Gehalt an reduziertem und oxydiertem Glutathion in Leber und M. gastrocnemius normal war, dabei jedoch der der Katarakt-Linse an reduziertem Glutathion gleich Null, wovon eine Wiederherstellung zu normalen Verhältnissen unmöglich war.

Nach allem erhellt, dass das red. Glutathion bei den Muskeln, deren Glutathiongehalt nur ein geringer ist, auch nach der Verabreichung von Naphtalin keine grossen Schwankungen zeigt, dass dagegen bei Leber und Augenlinse, deren Glutathiongehalt ein recht hoher ist, innerhalb 3 Tagen nach der Naphtalinverabreichung eine Verminderung eintritt. Der Gehalt an oxydiertem Glutathion wird bei der Leber nach der Verabreichung von Naphtalin etwas vermindert, bei der Augenlinse und dem M. gastrocnemius aber leicht vermehrt.

Aus allem Gesagten geht hervor, dass der Glutathiongehalt im Körper nach der Naphtalinverabreichung während mindestens 3 Tagen vermindert ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen in Kapitel I und III, d. h. mit den Untersuchungen betr.

die Schwefelausscheidung im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin gut überein.

III. BESTIMMUNG DER ÄTHER- UND ANORGANISCHEN SCHWEFEL-
SÄURE, DES NEUTRALSCHWEFELS UND DER GLUKURONSÄURE IM
HARN NACH DER VERABREICHUNG VON NAPHTALIN.

Verf. hat weiter Untersuchungen über die Ausscheidung der Glukuronsäure nach Naphtalinverabreichung angestellt. Es wird allgemein anerkannt, dass das Naphtalin in stärkerer Masse als seine Derivate kataraktbildend wirkt, und es sind daher Untersuchungen darüber angebracht, festzustellen, ob die Ursache für diese Erscheinung nicht vielleicht darin liegt, dass die Derivate des Naphtalins sich mit Glukuronsäure verbinden und ausgeschieden werden, während das Naphtalin hauptsächlich in Form von schwefelsauren Verbindungen ausgeschieden wird.

Lesnik und Nencki (1888) haben mit Hunden und Menschen Versuche angestellt, in denen sie diesen 3.0–5.0 g α - oder β -Naphtol verabreichten; sie fanden dabei, dass nur ein geringer Teil des Naphtols in Form von Ätherschwefelsäure, der grösste Teil aber in Form von Glukuronsäure ausgeschieden wird. Edlefsen (1905) hat an Tiere kleine Mengen Naphtalin verabreicht (0.5–0.75 g) und fand, dass danach der grösste Teil des β -Naphtols als Glukuronsäure, und der kleinere als Ätherschwefelsäure ausgeschieden wurde, und dass nach Verabreichung kleiner Mengen β -Naphtol (0.3–0.5 g) nur ausnahmsweise kleine Mengen β -Naphtolglukuronsäure im Harn nachweisbar waren, während der grösste Teil des Naphtols als Ätherschwefelsäure ausgeschieden wurde. Chiray (1922) hat bei Menschenharn die Glukuronsäuremenge festgestellt und fand, dass die Schwankungen in dieser denen der gebundenen Schwefelsäure parallel verlaufen, und dass die Glukuronsäurebildung als eine Abwehrreaktion gegen gewisse Gifte aufzufassen ist.

Händel (1924) beschrieb die Glukuronsäure und Ätherschwefelsäure-Verbindung als eine Abwehrreaktion gegen das Eindringen von Giften in der Leber deren Fähigkeit bei Leberschädigungen herabgesetzt wird.

Bestimmungsmethode. Die Bestimmung der anorganischen Schwefelsäure und Ätherschwefelsäure habe ich unter 1) beschrieben. Die Bestimmung des Neutralschwefels habe ich durch Bestimmung des Gesamtschwefels nach Benedict, modifiziert nach Denis, ausgeführt. 25 ccm Harn werden in einer Abdampfschale von etwa 10 bis 12 cm Durchmesser mit 5 ccm der Veraschungslösung (Lösung enthaltend 25% Kupfernitrat, 25% NaCl und 10% Ammoniumnitrat) versetzt und auf einem Wasserbade zum Trocknen gebracht. Dann erhitzt man die Schale allmählich zuerst mit kleiner Flamme und schliesslich bis zur Rotglut, die man 10–15 Min. erhält. Nach dem Abkühlen gibt man 20 ccm 10% ige HCl hinzu und erwärmt leicht bis zur Lösung. Man filtriert die Lösung in einen 200 ccm fassenden Erlenmeyerkolben und spült mit heissem Wasser nach, so dass das Gesamtvolumen 100–150 ccm beträgt. Das Kölbehen wird zum Sieden erhitzt, langsam mit 15 ccm unter 5% iger Bariumchloridlösung versetzt, und der Niederschlag dann, wie angegeben, behandelt. Daneben ist eine Blindanalyse mit der gleichen Menge der angewandten Reagentien auszuführen, da Kupfernitrat mitunter Schwefel enthält. Ein erhaltener Blindwert ist vom Analysenwert in Abzug zu bringen.

Bestimmung der Glukuronsäure im Harn. Ich habe die Bestimmung der Glukuronsäure nach Händel ausgeführt. 10 ccm Harn werden mit 20 ccm 10% ige. Bleiessig und 1.0 ccm 10% ige. Ammoniak gefällt; den Niederschlag lässt man sich absetzen und filtriert hierauf durch ein gehärtetes Filter (Schleicher & Schüll 589). Nach dem Trocknen bei 60–70°C bringt man den Niederschlag quantitativ vom Filter in einen 200 ccm fassenden Kjeldahlkolben. Der Niederschlag wird im Kolben mit 60 ccm konz. HCl übergossen und unter Rückflusskühlung 15 Minuten im Sieden erhalten. Nach dem Abkühlen spült man einige ccm Wasser durch den Kühler in den Kolben; dann wird mit fester Soda genau neutralisiert. Jetzt schaltet man den Kolben in eine Wasserdampfdestillationsapparatur ein und destilliert energisch, bis 100–120 ccm übergegangen sind. Das Destillat wird in zwei gleiche Teile geteilt, jeder Teil mit 30 ccm N/100 Kaliumbisulfatlösung versetzt, umgeschüttelt und 20 Minuten stehen gelassen.

Man stellt gleichzeitig einen Leerversuch mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers an. Nach 20 Minuten setzt man in jede Vorlage 40 cem N/100-Jodlösung zu und titriert aus einer Bangschen Mikrobürette mit N/200-Thiosulfatlösung das überschüssige Jod zurück.

Eigene Versuchsergebnisse.

Über die Bestimmung der Äther- und anorganischen Schwefelsäure habe ich schon im Kapitel 1 Abschnitt A berichtet. Der Neutralschwefel (Tabelle VIII und Kurve 5) nimmt am 1. Tage nach der Verabreichung von Naphtalin auf das 4fache des Normalwerts zu, am 2. Tage sinkt der Gehalt auf das 3fache und am 3. Tage auf das 2,5fache des Normalwerts, bis dann schliesslich am 5.-7. Tage der Normalwert erreicht wird. Die Glukuronsäure erfährt am 1. Tage eine Vermehrung um das ca. 7fache des Normalwerts, am 2. Tage nur noch um das 4,5fache, am 3. Tage um das 3fache, und vom 4. Tage ab liegt der Wert schwankend um den Normalwert.

Verf. hat dann an 3 Kaninchen täglich während 3 Wochen 0,5 g α -Naphtol verabreicht (Tabelle IX) und bei diesen Tieren die Augenveränderungen untersucht. Diesen Versuch überlebte nur eines der Tiere, die anderen beiden starben am 12. bzw. 16. Versuchstage. Bei dem gesunden Tiere waren auch nach 3 Wochen, bei den eingegangenen Tieren bis zum Exitus keinerlei Augenveränderungen festzustellen; jedenfalls ist sicher, dass wie Igerscheimer und Ruben (1910) schon fanden, das α -Naphtol in gewissen Mengen giftig wirkt. Bezüglich der Augenveränderungen fanden ja auch schon Kolinski (1889), Salffner (1904) und Adams (1930), dass das α - und β -Naphtol und verschiedene andere Naphtalinderivate bei Verabreichung an Kaninchen keine Veränderungen hervorrufen.

In unserem Laboratorium hat Moriyama nach der Naphtalinderivat-Verabreichung ebenso wie ich eine hochgradige Zunahme der Glukuronsäure, eine Nichtveränderung oder eine Abnahme in dem Neutralschwefelgehalt und im Falle der α - und β -Naphtol-Verabreichung eine Zunahme, im Falle der Verabreichung von

TABELLE VIII.

Durchschnittswerte der Äther und anorganischen Schwefelsäure, des Neutralschwefels und der Glukuronsäure im Harn nach der Naphtalin-Verabreichung (Durchschnitt von 5 Fällen).

Tage nach d. Naphtalin- Verabreichung	Äther- schwefel- säure (mg)	Anorganische Schwefelsäure (mg)	Neutral- schwefel (mg)	Glukuron- säure (mg)
Normal	26,23	130,05	67,15	71,43
1. T.	99,44	75,01	269,07	485,95
2. T.	39,51	11,14	217,54	310,38
3. T.	32,87	24,09	179,96	214,99
4. T.	15,14	38,87	73,24	74,95
5. T.	14,40	76,00	55,39	76,53
6. T.	19,55	141,01	56,12	76,97
7. T.	20,26	130,34	60,06	74,82

Bemerkungen.

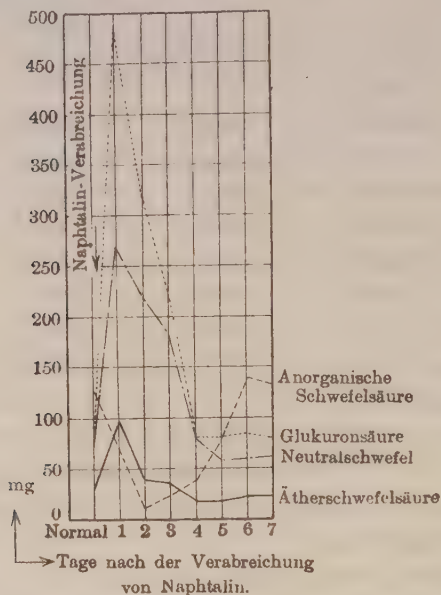
5 Fälle { Linsentrübung 0.
Retinitis 4.
Linse und Retina intakt 1.

β -Naphtylamin eine starke Abnahme in dem Gehalt an Ätherschwefelsäure festgestellt.

Ein Vergleich meiner Ergebnisse mit denen von Moriyama zeigt, dass nach der Naphtalinverabreichung dieses, eher denn es als Glukuronsäureverbindung im Harn ausgeschieden wird, im Körper sich leicht mit der SH-Gruppe verbindet und dann in Form der ungiftigen Ätherschwefelsäure-Bindung oder als Neutralschwefel ausgeschieden wird. Im Gegensatz hierzu werden die verabreichten Naphtalinderivate vielleicht als Nicht-S-Verbindung, wie es die Glukuronsäure ist, ausgeschieden. Möglich ist auch, dass durch die Verabreichung von Naphtalin im Körper ein Mangel an SH eintritt, wodurch die Linse empfindlich beeinflusst wird, und weiter, wie Tsuji (1932) schon mitteilte, das der Koagulation des α -Kristallin entgegenwirkende β -Kristallin vermindert wird, und daher sich das α -Kristallin leicht trübt. Vielleicht spricht dafür auch die Tatsache, dass bei Naphtalinverabreichung Linsentrübung auftritt, während das bei der Verabreichung von Naphtalinderivaten nicht der Fall ist.

Kurve 5.

Kurve der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure, des Neutralschwefels und der Glukuronsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin.



IV. BESTIMMUNG DER ÄTHER- UND ANORGANISCHEN SCHWEFEL- SÄURE, DES NEUTRALSCHWEFELS UND DER GLUKURONSÄURE IM HARN NACH DER VERABREICHUNG VON NAPHTALIN BEI PANKREASDIABETES.

Zuerst hat Berndt (1834) darauf hingewiesen, dass zwischen Diabetes und Katarakt irgendeine Beziehungen bestehen, Burdon-Cooper (1922) fand, dass der Zuckergehalt des Kammerwassers geringer war als der des Harns, weiter dass bei dem experimentellen Pankreasdiabetes die Linse klar war, und dass der Cholesteringehalt des Kammerwassers zugenommen hatte. Chiray (1922) fand, dass im Diabetikerharn selbstverständlich immer reichliche Mengen Glukuronsäure enthalten sind. Duke-Elder (1925) nahm bei dem akuten Diabetes einen typischen osmotischen

TABELLE IX.

Nur α -Naphthol 0,5 g täglich während 3 Wochen gegeben.3 Fälle { Augenveränderungen 0.
Exitus 2.

No.	Beobachtungstage	Augenveränderungen	Diarrhoe	Bemerkungen
1.	5. T.	—	—	
♀	10. T.	—	—	
Weiss	15. T.	—	—	
2398 g	20. T.	—	—	
	25. T.	—	—	n.b.
2.	5. T.	—	—	
♀	7. T.	—	—	
Weiss	10. T.	—	—	
2129 g	12. T.	—	+	Exitus
3.	5. T.	—	—	
♀	7. T.	—	—	
Weiss	10. T.	—	—	
	13. T.	—	—	
2462 g	16. T.	—	—	Exitus

Einfluss an, bei dem durch Steigerung der Zuckerkonzentration das statische Gleichgewicht der Flüssigkeit verändert wird, sodass sie leicht in die Linse eindringen kann.

Takahashi (1926) berichtete auf Grund seiner Untersuchungen, dass bei Hunden mit experimentellem Pankreasdiabetes der Zuckergehalt des Blutes und des Kammerwassers fast völlig derselbe war. Goldschmidt (1926) berichtete, dass bei dem Diabetiker-katarakt das Kammerwasser sauer reagiert und in seiner Pufferungsfähigkeit geschädigt war. Michael und Vancea (1927) führten den Naphtalinkatarakt auf Pankreasdysfunktion zurück, da bei täglich zweimaliger Injektion von Insulin in solchen Fällen innerhalb 5–6 Tagen die Linsentrübung verschwand. Das Insulin verhindert die rasche Koagulierung des Linseneiweisses und vermehrt, auch bei Vergiftung mit grossen Dosen Naphtalin, die Widerstandskraft. Büttner (1929, 1930) schliesslich fand, dass

in leichten Fällen von Diabetes die Ausscheidung von Neutralschwefel fast normal, in schweren Fällen dagegen stark vermehrt ist, und dass diese ebenso auch bei Ratten mit experimentellem Phlorrhizindiabetes gesteigert ist.

Verf. hat bei Kaninchen durch möglichst vollständige operative Entfernung des Pankreas Diabetes erzeugt, darauf Naphtalin verabfolgt, und dann im Harn die Äther- und anorganische Schwefelsäure bestimmt.

Bestimmungsmethode. Vor der Operation wurde während drei Tagen täglich eine Bestimmung des Normalwerts vorgenommen. Zur Operation wurden die Tiere in der Rückenlage fixiert; die Bauchdecke wurde mittels Alkohol desinfiziert und darauf Laparotomie in der Mittellinie vorgenommen. Dann wurde das Duodenum herausgezogen, in der Nähe des Ductus pancreaticus unterbunden und der Kopfteil durchschnitten. Dann wurden auch im Schwanzteil die aus den Milzgefäßen sich verästelnden und in den Pankreas eindringenden Gefäße unterbunden, und der Schwanzteil wurde durchschnitten. Darauf wurde die Bauchwand zweischichtig vernäht und der Operationsherd einige Mal mit Alkohol bepinselt. Nach der Entfernung des Pankreas wurde dann der ganze Tagesharn täglich untersucht, und darauf 5.0 g Naphtalin und 2.0–4.0 g Traubenzucker verabreicht.

Versuchsergebnisse.

Die Ätherschwefelsäure (Tabelle X und Kurve 6) wird am Tage der Pankreasentfernung vermehrt, und zwar um das Doppelte des Normalwerts; am 1. Tage nach der Naphtalinverabreichung wird sie um das 5fache, am 2. Tage um das 3fache, am 3. um das 2.5fache, vermehrt, nimmt dann allmählich weiter ab und erreicht nach einer Woche wieder die Norm. Der Gehalt des Harns an anorganischer Schwefelsäure zeigt am Tage nach der Pankreasentfernung eine Vermehrung um ca. 50%, nach der Verabreichung von Naphtalin aber beträgt er am 1. Tage nur noch die Hälfte, am 2. Tage nur noch $\frac{1}{4}$ des Normalwerts; danach tritt allmählich im Verlauf der Zeit Rückkehr zur Norm ein. Der Gehalt an Neutralschwefel ist am Tage nach der Pankreasentfernung etwas gesteigert.

gert; am 1. Tage nach der Verabreichung von Naphtalin ist er um ca. das 3.5fache, am 2. Tage um das 3fache gesteigert; dann tritt nach ca. 5 Tagen Rückkehr zur Norm ein.

Die Glukuronsäure erfährt nach der Pankreasentfernung eine Verminderung um 20%; am Tage nach der Verabreichung von Naphtalin ist sie um das 8fache, am 2. Tage um das 5.5fache und am 3. Tage nur noch um das 4fache vermehrt. Allmählich tritt dann aber auch hier Rückkehr zur Norm ein. Ein Vergleich dieser Ergebnisse IV mit denen des Kapitels III ohne Pankreasentfernung ergibt das folgende:

Ätherschwefelsäure.—Tageswerte bezogen auf den Normalwert als Einheit.

Kap. IV.	5.0	3.2	2.4	1.5	1.3	1.0	1.1	Sa. 15.5
Kap. III.	3.8	1.5	1.3	0.6	0.5	0.7	0.8	Sa. 9.2

TABELLE X.

Durchschnittswerte der Äther- und anorganischen Schwefelsäure, des Neutralschwefels und der Glukuronsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin bei Pankreasdiabetes (Durchschnitt von 7 Fällen).

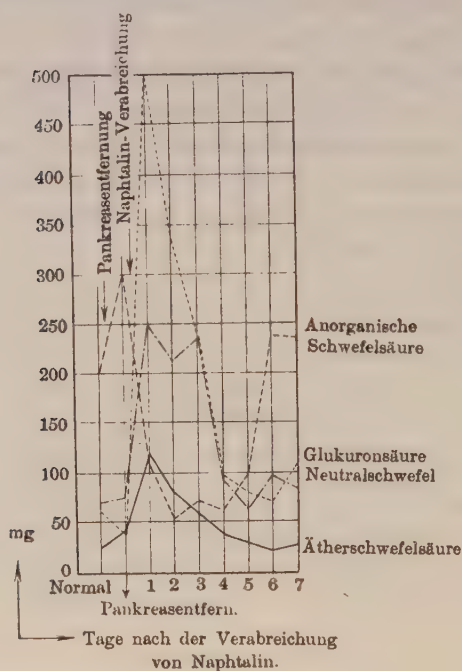
Tage nach der Verabreichung von Naphtalin	Äther-schwefelsäure (mg)	Anorganische Schwefelsäure (mg)	Neutral-schwefel (mg)	Glukuron-säure (mg)
Normal	24,43	201,73	74,89	62,31
Pankreasentfernung	43,43	299,23	80,40	43,62
1. T.	122,57	112,95	247,13	497,29
2. T.	78,62	53,24	208,36	336,68
3. T.	58,11	74,93	231,31	233,42
4. T.	37,47	64,39	96,98	103,32
5. T.	31,71	102,25	62,73	80,97
6. T.	25,87	235,59	98,68	70,49
7. T.	28,17	232,55	80,26	107,39

Bemerkungen.

7 Fälle { Linsentrübung 0.
Retinitis 3.
Linse und Retina intakt 4.

Kurve 6.

Kurve der Äther- und der anorganischen Schwefelsäure, des Neutralschwefels und der Glukuronsäure im Harn nach der Verabreichung von Naphtalin bei Pankreasdiabetes.



Anorganische Schwefelsäure.

Kap. IV.	0.6	0.3	0.4	0.3	0.5	1.2	1.2	Sa. 4.5
Kap. III.	0.6	0.1	0.2	0.3	0.6	1.1	1.0	Sa. 3.9

Neutralschwefel.

Kap. IV.	3.3	2.8	3.1	1.3	0.8	1.3	1.1	Sa. 13.7
Kap. III.	4.0	3.2	2.7	1.1	0.8	0.8	0.9	Sa. 13.5

Glukuronsäure.

Kap. IV.	7.9	5.4	3.7	1.7	1.3	1.1	1.7	Sa. 22.8
Kap. III.	6.8	4.3	3.0	1.1	1.1	1.1	1.0	Sa. 18.1

Daraus geht also hervor, dass der Gehalt des Harns an Äther- und anorganischer Schwefelsäure ebenso wie an Neutralschwefel und Glukuronsäure bei den Versuchen in Kapitel IV (Pankreasentfernung) höher ist als bei intaktem Pankreas, was im Falle der Ätherschwefelsäure und der Glukuronsäure besonders deutlich ist.

Bei den Versuchen mit der Pankreasentfernung (Tabelle X) fanden sich unter 7 Fällen nur 3 Fälle von Retinitis, in allen übrigen Fällen waren Linse und Retina völlig intakt.

Weiter habe ich nach der Pankreasentfernung mittels der Nylander'schen Probe den Harnzuckernachweis geführt und dabei gefunden, dass diese 4-5 Tage p.op. stark positiv ausfiel, dann allmählich abgeschwächt wurde, am 6.-7. Tage nur noch spurweise auftrat oder gar negativ ausfiel. Aus diesem Ergebnis lässt sich, wie schon Renzi und Reale (1890), Farroni (1911), Neri (1914), Ishida (1929) und Momose (1931) annahmen, schliessen, dass zwischen Pankreas, Parotis und Nebennieren kompensatorische Beziehungen bestehen. Da aber nach Pankreasentfernung und Naphtalinverabreichung unter 7 Fällen sich nur 3 Fälle von Retinitis fanden, während in allen anderen Fällen Linse und Retina völlig intakt waren, scheint mir entschieden die Annahme von Michael und Vancea, dass bei dem Naphtalinkatarakt Pankreasdysfunktion irgendeine bedeutende Rolle spiele, etwas verfrüht zu sein.

Am Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. K. Kodama für die freundliche Leitung bei dieser Arbeit und gütige Durchsicht meines Manuskripts, sowie auch meinem hochverehrten Chef, Herrn Prof. Dr. H. Akaiwa, für Anregung und vielfach gütigst gewährte Unterstützung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Adams (1929): *Biochem. Journ.*, **23**, 902.
„ (1930): *Brit. Journ. ophth.*, **14**, 49.
Baumann u. Herter (1877): *Zeits. f. phys. Chem.*, **1**, 267.
Burdon-Cooper (1922): *Brit. Journ. of ophth.*, **6**, 385.
Büttner (1929): *Ver. d. deuts. Ges. f. Inn. Med.*, **16**, 506.
„ (1930): „ „ „ „ „ **17**, 169.
Chiray (1922): *Journ. méd. franc.*, **11**, 56.
(Ref. Ber. ü. d. ges. Phy. u. exp. Pharm., **17**, 175. 1923)

- Cohen, Kammer u. Killian (1928): Proc. Soc. exp. Biol. & Med., **25**, 677.
(Ref. Zentbl. f. d. ges. Ophth. u. ihre Grenz., **20**, 733, 1929).
Denis u. Reed (1927): Journ. of Biol. Chem., **13**, 51.
Duke-Elder (1925): Brit. Journ. of Oph., **9**, 167.
" " (1929): Recent advance in Ophthalmology.
Goldschmidt (1924): Arch. f. Ophth., **93**, 447.
" (1926): Zentralbl. f. d. ges. Ophth. u. ihre Grenz., **15**, 209.
Händel (1924): Zeits. f. d. ges. exp. Med., **42**, 172.
Igerscheimer u. Ruben (1910): Arch. f. Ophth., **74**, 467.
Lesnik u. Neneki (1888): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **24**, 167.
Michael u. Vancea (1926): Cpt. rend. d. sea. d. l. soc. d. biol., **94**, 291.
(Ref. Ber. ü. d. ges. Phy. u. exp. Pharm., **36**, 87).
" " (1927): Cpt. rend. d. sea. d. l. soc. d. biol., **96**, 1.
(Ref. Ber. ü. d. ges. Phy. u. exp. Pharm., **40**, 455).
Shoji (1927): Annal. d'occul., **164**, 343.
" (1931): Arch. d'opht., **48**, 28.
Stearns u. Lewis (1930): J. of biol. Chem., **86**, 93.
Takahashi (1926): Arch. f. Ophth., **117**, 479.
Tassmann (1928): Arch. f. Ophth., **59**, 431.
Tsuji (1932): J. of Biochem., **15**, 33.
Yamazaki (1930): J. of Biochem., **12**, 207.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER GLYKOGEN- BILDUNG DER LEBER DURCH GALLENSÄURE.

VON

TSUNEO KURAMOTO.

*(Aus dem biochemischen Institut der medizinischen Universität
Okayama, Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 11. Oktober 1933)

Seit der Untersuchung von Misaki (1927) ist allgemein anerkannt, dass die Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure gefördert wird. Neuerdings hat Miki (1932) bei seinem Versuch gefunden, dass bei der Glykogenbildung der Leber von splachnikotomierten Kaninchen eine kleine Menge von Adrenalin mit Cholsäure synergisch fördernd wirkt, während dagegen nach Fuziwarara (1933) die Glykogenbildung der Leber von splenektomierten Kaninchen durch Zufuhr einer kleineren Menge Adrenalin mit Cholsäure herabgesetzt wird. Dabei hat der letztere die Ansicht vertreten, dass diese herabgesetzte Glykogenbildung der Leber auf der durch die Splenektomie vermehrten Gallensäurebildung in der Leber beruhen müsse.

Und in der Tat hat Tanaka (1933) die Vermehrung der Gallensäure in der Fistelgalle eines splenektomierten Hundes auch experimentell bewiesen.

Schon früher hat auch Tsuji (1930) bei seinem Versuch beobachtet, dass die alimentäre Hyperglykämie des Kaninchens durch Zufuhr einer grösseren Menge von Cholsäure verstärkt wird.

Auf Grund der Daten der obengenannten Autoren muss die Glykogenbildung der Leber durch eine überschüssige Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt werden, gleichgültig ob dabei eine kleinere Menge von Adrenalin, welches die Glykogenie der Leber fördern kann, mit der Cholsäure verabreicht wird.

In diesem Sinne habe ich die Glykogenbildung der Leber bei Kaninchen unter parenteraler Zufuhr einer kleineren Menge

Adrenalin mit kleineren und grösseren Mengen von Cholsäure untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden kräftige männliche Kaninchen verwendet, die volle 4 Tage lang in Hunger gehalten wurden. Diese Kaninchen wurden in 2 Gruppen geteilt. Der einen Gruppe wurden eine Stunde nach der intravenösen Injektion von 2 ccm einer 50%igen Glykoselösung pro Kilo 0,01 ccm einer 0,1%igen Adrenalinchloridlösung und 0,5 ccm einer 1%igen Na-Cholatlösung pro Kilo hintereinander subcutan verabreicht. Der anderen Gruppe der Kaninchen wurden anstatt 0,5 ccm einer 1%igen Na-Cholatlösung 3 ccm derselben Lösung verabreicht.

3 Stunden nach der Zuckerzufuhr wurden die Kaninchen unter Verblutung mit Nackenschlag getötet; die schnell herausgeholte Leber wurde gewogen. Der Glykogengehalt der Leber wurde nach der Methode von Iwasaki u. Môri und Bertrand bestimmt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I und II zusammengestellt.

TABELLE I.

Nr.	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	Glykogen in %.	Bemerkungen
	vor dem Hunger	nach Hunger			
1	2300	2070	43,3	1,320	Glukose, Adrenalin u. kleinere Menge Cholsäure
2	2430	2130	45,5	1,864	
3	2400	2200	34,4	2,106	
4	2100	1950	49,3	2,753	
5	2270	2020	40,3	2,473	
6	2250	2020	34,3	2,531	
7	1770	1630	35,1	2,603	
8	2500	2330	50,1	2,526	
9	2800	2650	46,5	2,133	
10	2100	1940	39,0	2,364	
Durchschnittswert:				2,317	

TABELLE II.

Nr.	Körpergewicht		Lebergewicht (g)	Glykogen in %.	Bemerkungen
	vor dem	nach Hunger			
1	2100	1880	42,5	2,110	Glukose, Adrenalin u. grössere Menge Cholsäure
2	2050	1810	37,6	1,726	
3	2450	2150	50,3	2,498	
4	2350	2150	36,8	2,239	
5	2100	1930	35,3	2,108	
6	1690	1450	36,5	1,779	
7	2470	2220	39,2	1,715	
8	1660	1520	37,8	1,834	
9	2720	2500	52,0	2,077	
10	1940	1650	39,6	1,725	
11	2210	1880	37,4	1,917	
12	2220	2060	45,8	2,499	
Durchschnittswert:				2,012	

Aus den Tabellen I und II lässt sich ersehen, dass der durchschnittliche Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr der kleineren Menge von Adrenalin und Cholsäure 2,317% und bei Zufuhr der kleineren Menge von Adrenalin mit der grösseren Menge von Cholsäure 2,012% beträgt.

Die Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr der kleineren Menge von Adrenalin und Cholsäure wird durch vermehrte Zufuhr von Cholsäure um 13,15% herabgesetzt, obwohl dabei in beiden Fällen dieselbe kleinere Menge von Adrenalin gegeben wurde.

Die die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure wird also durch deren überschüssige Zufuhr vielmehr herabgesetzt.

Diese Daten stimmen gut mit dem Ergebnis von Fuziwaras überein, dass die die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung einer kleineren Menge von Adrenalin bei splenektomierten Kaninchen durch Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt wird.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die die Glykogenie in der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure wird durch deren überschüssige Zufuhr herabgesetzt.

LITERATUR.

- Fuziwara, K. (1933): Bioch. Zschr., **259**, 203.
Miki, T. (1932): Bioch. Zschr., **247**, 445.
Misaki, K. (1927): Jl. of Bioch., **8**, 235.
Tanaka, T. (1933): Jl. of Bioch., **18**, 369.
Tsuji, K. (1930): Jl. of Bioch., **12**, 139.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.
III. Micromethode for Determination of Glucosamine
in Blood, Tissue and Urine

By

KINJI KAWABE.

*(From the Medico-Chemical Institute, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)*

(Received for publication, November 20, 1933)

In 1901 F. Müller found that mucin gave a distinct colour reaction with Ehrlich's reagent when it was heated in advance with a little alkali or barium hydroxide and suggested that it might be due to the partially acetylated glucosamine. Recently F. Zuckerkandl and L. Messiner (1931) made use of this reaction for quantitative analysis of this substance. The principle exists in hydrolysing glycoproteid such as ovomucoid and mucin, acetylation of the freed glucosamine with sodium methylate and acetic anhydride, followed by boiling with KOH and by finally comparing the red colour developed by addition of Ehrlich's reagent with that of the standard glucosamine solution. This method was applied by Winter (1932) for cartilage analysis although he mistook chondrosamine for glucosamine.

In order to devise general methods for determination of glucosamine in tissue, blood and urine, the present author first made trials in order to ascertain whether or not the glucosamine added to blood or tissue can be recovered completely for the application of Zuckerkandl and Messiner's method. In the case of urine he found that when the urine which contains this aminosugar is condensed without any preliminary manipulations it gives, almost no colour reaction. Several urine components, particularly urea and phosphate, interfere with the reaction so that fairly complicated procedures were unavoidable for removing them from urine.

As the glucosamine is not present in a free state, either in

normal tissue and blood or in urine, the present methods concern, naturally, only that which is retained in tissues or excreted in urine, when administered into the body.

REAGENTS.

for blood analysis.

1. 4% Trichloroacetic acid solution.
2. Ether.
3. 5% Sodium methylate in methanol.

Methanol is purified and dried by the following procedure:

To 1 liter of methanol in a 3 liter round bottom flask are added 100 gm powdered CaO and 3-4 spoonfuls of charcoal. The flask is fixed with a reflux condensor holding a calcium chloride tube, and the methanol is boiled for 24 hours on the bath, and then it is distilled into a receiver, avoiding moisture by connecting a calcium chloride tube. The fraction boiling at 65° is collected.

Sodium methylate solution is prepared before each analysis and cooled under running water.

4. Acetic anhydride
5. Absolute alcohol
6. 30% KOH-solution
7. Ehrlich's reagent;

2 gm. *p*-dimethylaminobenzaldehyde are dissolved in 50 cc. conc. HCl (sp. gr. 1.19) and made up to 100 cc. with distilled water.

8. Artificial standard.

- a) *Stock solution*: 0.1 gm. of phenol red is dissolved in 28.2 cc. of 0.01 N NaOH in a 500 cc. volumetric flask and filled up to the mark with distilled water.
- b) *Standard*: 0.8 cc. stock solution is added to 100 cc. of the borate buffer solution (pH 8.6). The borate solution is prepared, according to Clark and Lubs, by mixing 50 cc. *M*/5 H₃BO₃, *M*/5 KCl solution with 12.0 cc. *M*/5 NaOH and making up to 200 cc. with water. The colour depth of this standard

corresponds exactly to that of 1 mg glucosamine chlorhydrate.

for tissue analysis.

7% trichloroacetic acid is used instead of 4% solution.

for urine analysis.

In addition to the reagents for blood analysis:

1. 15% trichloroacetic acid solution instead of 4% solution.
2. solid urease preparation prepared according to van Slyke and Cullen (1914).
3. *M*/5 acid potassium phthalate solution.
4. 1 n. HCl.
5. 10% lead acetate solution.
6. H₂S-gas.

PROCEDURE.

Blood analysis.

2 cc. oxalate blood is laked with 2 cc. water, deproteinized by shaking with 16 cc. of 4% trichloroacetic acid solution. The mixture is let stand for 10 minutes and filtered. The filtrate is poured into the extraction tube of a mico Kumakawa and Sudo's apparatus, which is of the size 9 cm × 2.5 cm under the side arm, and extracted exhaustively for 1 hour. Ether is then removed by bubbling air. 10 cc. of the liquid is pipetted into a small porcelain dish, evaporated on the bath to dryness. To the residue, is added 1 cc. sodium methylate solution, mixed and then acetylated under cooling, by pouring 0.3 cc. acetic anhydride, drop by drop. After 1 minute, the reaction mixture is treated with 1 cc. of water and transferred into a big tube (20 cm × 3 cm), washed quantitatively with two 0.75 cc. portions of water. Then, to it are added 1 cc. of absolute alcohol and 0.5 cc. of 30% KOH solution. The solution is boiled over a free flame for 8 seconds, whereupon it is cooled quickly in icewater. When cooled well, it is mixed finally with 3 cc. of Ehrlich's reagent and after standing for 5 minutes, the colour is compared with the artificial standard, set usually at

15 mm.

Calculation.

$$\frac{\text{mg glucosamine}}{\text{in 100 cc. blood}} = \frac{15}{\text{Reading of the unknown}} \times 100 \times 0.83.$$

Tissue analysis.

A measured quantity of tissue (0.2–0.6 gm.) is ground well in a mortar, poured into a big stoppered tube with 4–5 cc. water, added to with 10 cc. of 7% trichloroacetic acid, and filled up to the mark at 20 cc. with water. After standing for 1 hour, it is filtered. Further procedures with the filtrate are followed as described in blood analysis except that the evaporation is stopped when the volume is reduced to less than 0.5 cc. and dried up in vacuo above P_2O_5 .

Calculation.

$$\frac{\text{mg glucosamine}}{\text{in 100 gm. tissue}} = \frac{15}{\text{Reading of the unknown}} \times 0.83 \times \frac{100}{\left(\frac{\text{tissue taken}}{\text{in gm.}} \right) \times 1/2}$$

URINE ANALYSIS.

When the urine is alkaline, it should be acidified with a few drops of 15% trichloroacetic acid.

1 cc. of the urine is taken and diluted to 7 cc. mixed with 0.3 gm. of urease preparation and 3 cc. of *m*/5 acid potassium phthalate and placed in the bath at 40°C for 1 hour in order to split up all the urea.

Then 1 cc. 1 *N* HCl and 9 cc. 10% lead acetate solution are added and the mixture is filtered. The filtrate is treated with H_2S and PbS is filtered off on a Büchner funnel. H_2S in the liquid is expelled by aeration and next phthalate is removed by ether extraction (Extraction is continued for 1 h.). Finally, ether is removed as described above and 5 cc. of the liquid is evaporated in

an evaporating dish. When the solution is condensed to a small volume (about 0.5 cc.) and begins to tinge yellowish, it is taken from the bath and dried up in *vacuo* above P_2O_5 .

The residue is treated further, as described above.

Calculation.

$$\frac{\text{mg glucosamine}}{\text{in 100 cc. urine}} = \frac{15}{\text{Reading of the unknown}} \times 0.83 \times \frac{100}{0.25}$$

REMARKS.

I. Blood:

Several deproteinizing reagents were examined. The proper filtrate should contain all the glucosamine and no substance which interferes with further chemical reactions. In the present method of analysis, the filtrate has to be evaporated to dryness for acetylation of glucosamine. Therefore, if an abundant mass of the deproteinizing reagent comes over into the filtrate, it has to be removed, especially when it spoils the acetylation, dehydration or colour reaction.

EXPERIMENTS.

1. 10 cc. Folin's blood filtrate were added with 1 mgm glucosamine chlorhydrate and evaporated. The white residue gave no colour reaction to the Ehrlich's reagent after being acetylated and dehydrated. The filtrate contains some substance, probably tungstic acid, which spoils the reaction.

2. *Alcohol*: a). 1 cc. blood was deproteinized with 19 cc. absolute alcohol. 10 cc. filtrate was evaporated after addition of 0.5 cc. 0.01 N HCl and 1 mg glucosamine chlorhydrate. The residue was treated in the procedures, but developed only very faint colour.

b) 2 cc. blood was acidified with 1 cc. 0.1 N H_2SO_4 and shaken with 17 cc. absolute alcohol, and with the filtrate the above procedures were followed, but it lead to the same result. Some interfering substances are present in the alcohol filtrate.

3. Fujita and Iwatake's method are not recommendable,

as the colour development is insufficient even when glucosamine is added to the blood filtrate. In an experiment of this case, where 1 mg of glucosamine was added, the colour intensities corresponded to 0.84, 0.85 and 0.87 mg.

4. Contrary to these methods, trichloroacetic acid gives quite a suitable filtrate. In the examples given below, the procedures described were followed, except that water for laking blood was replaced by an equal quantity of glucosamine chlorhydrate solution.

Examples:

TABLE I.

blood (or rabbit) Volume cc	glucosamine chlorhydrate added mg	filtrate evaporated cc	glucosamine recovered in terms of its chlorhydrate	
			mgm	%
2	2 (in 2 cc water)	10 (corresponding to 1 cc blood)	1.0	100.0
2	2 (,,)	10 (,,)	1.003	100.3
2	2 (,,)	10	1.0	100.0
2	4 (in 2 cc water)	10	1.94	97
2	"	10	1.96	98
2	"	10.	1.69	98

II. Tissues Examples:

TABLE II.

tissue pulp (gm)	glucosamine chlorhydrate added mgm.	filtrate evap cc.	glucosamine recovered in terms of gl. chlorhydrate	
			mg	%
0.5 (rabbit liver)	2	10 (corresp. to 0.25 gm tissue)	1.0	100
0.2 (liver of guinea-pig)	"	10 (corresp. to 0.1 gm tissue)	0.99	99

0.2	2	10	1.01	101
0.2	"	"	0.97	97
0.2	6	"	2.94	98
0.2	"	"	3.09	103
0.2	"	"	2.91	97
0.2	2	"	1.01	101
(kidney of guinea-pig)				
0.2	"	"	0.99	99
0.2	"	"	0.98	98
0.2	6	"	3.03	101
0.2	"	"	3.09	103
0.2	"	"	2.88	96

III. Urine:

When rabbit urine was acidified with HCl, and decolourized with charcoal, the filtrate produced yellow colour with the Ehrlich's reagent. Therefore urea, allantoin, alloxan, uric acid, creatine, creatinine, hippuric acid and acetone were examined, and the former three were found to cause this colour development. As the normal urine of mammals contains but traces of alloxan and allantoin, the urea only has to be removed. It was destroyed by urease, and the filtrate after treatment with charcoal was found to show no yellow colour reaction to the reagent. Besides urea, such constituents of urine as phosphate and pigments also spoil the analysis.

Examples of urine analysis:

TABLE III.

Urine cc.	glucosamine chlorhydrate added mgm	filtrate evap cc.	glucosamine chlorhydrate recovered	
			mg	%
1	4	5	1.016	101.6
"	"	"	0.99	99
"	"	"	1.01	101
"	12	"	2.91	97
"	"	"	3.09	103
"	"	"	2.85	95

IV. Colour intensity developed by glucosamine with Ehrlich's reagent is exactly proportional to the quantity applied between the limits from 0.5 to 5 mg.

TABLE IV.
(artificial standard set at 15 mm).

glucosamine chlorhydrate analysed mgm	Reading mm	Colour intensity corresponds to
0.5	27	0.56
1	15	1
2	7.5	2
3	5.1	2.94
4	3.8	3.94
5	3.0	5.0

V. Such a small quantity as 0.1 mg can be detected by this method.

VI. A practical example will be given:
Glucosaminechlorhydrate (2 g per kilogramme body weight) was injected subcutaneously to a male rabbit weighing 2000 gm. The animal was killed after 3 hours and glucosamine contents were determined:

TABLE V.

	Vol. or weight	taken for analysis	glucosamine content mgm
urine	23 cc (collected for 3h)	1 cc	1029.2 in 100 cc
blood		4 cc	76.7 "
liver	39 gm	0.6 gm	243.4 in 100 gm
kidney	9.5	"	439.9 "
lung	7.2	"	trace
stomach	21.7	"	174.3
small intestine	35.0	"	trace
pancreas	1.8	"	trace
skeletmuscle		"	—

SUMMARY.

Micromethods for determination of glucosamine in tissue, blood and urine have been described. A practical example also is given.

Thanks are due to Prof. K. Kodama for kindly making criticisms and to Assistant-Prof. H. Masamune for suggesting this research and for his constant stimulating help.

REFERENCES.

- Müller, E. (1901): Z. f. Biol., **42**, 501.
Winter, W. (1932): Bioch. Z., **246**, 10.
Van Slyke and Cullen (1914): Jour. Biol. Chem., **19**, 211.
Zuckerkindl, F. u. Messiner, L. (1931): Bioch. Z., **236**, 19.

STUDIES ON SECRETAGOGUES IN GASTRIC JUICE OF DOG.

By

MASAKI MIYAZAKI.

(From the Internal Clinic of Nagasaki Medical College.
Director: Prof. Dr. M. Tsudjii.)

(Received for publication, November 24, 1933)

Edkins has observed in 1906 that the extract obtained from the pyloric mucous membrane and the cardiac mucous membrane causes a secretion of gastric juice, when injected into the blood vessels. According to him, this substance, for which he has suggested the name "gastrine", is present as a mother substance in the pylorus and cardia; during the digestion it becomes soluble, and on entering into the blood stream, it stimulates the flow of gastric juice. Since this observation of Edkins, a good deal of work on the hormone of stomach has been carried out by many investigators. From the experiment of Ivy and Farrel (1925) there is no doubt that such substance is transported to the fundic glands by the blood vessel to cause the glandular secretion. But in that case the question whether the secretion is caused by a physiologic hormone in the sense of Edkins, which is formed only in the stomach, or by the entering of substances contained in food or in the products of the digestion, into the blood stream, which stimulate the flow of gastric juice, has not yet been decided. For the gastric secretion is caused not only by the extract from the gastric mucous membrane, but also by the extracts from various other organs or muscle, and not only by histamine or choline, which is considered as the gastric hormone by some investigators, but also by simple N-containing compounds, as, for example, methylguanidine, amino-acids etc., and the large number of these substances are components of meat which is well known to be the most powerful excitant of the gastric secretion. Although all these substances cause the flow of gastric juice, the mechanism of

their action on the glandular cells is not clear, in spite of numerous investigations.

Since a long time it has been well known that gastric secretion is stimulated by morphine injection, and that the injected morphine appears largely in the stomach. These two facts are clinically applied to the treatment of some gastric diseases or acute morphine poisoning. But if these facts are considered from the point of view of gastric juice, morphine is an excitant of gastric secretion, and the excitant itself is excreted into the stomach together with the gastric juice, and this explanation may be applied to the so-called gastrine. If the gastrine of Edkins, although according to him this substance does not exist in the fundus, is transported to the fundus to act on the secretic glands as he claims, the mechanism of action of this substance on the fundic glands will be similar to that of the morphine. Such consideration of ours has been proved on the basis of experiments by Frouin (1905) and Eisenhardt (1910), in which they have observed that the gastric juice caused a gastric secretion, when introduced in a parenteral way. This experimental fact has been reinvestigated later with the same result (Yoshida 1930, Shimizu and Matsui 1931, Sugishima 1932). Yoshida (1930) has observed that gastric juices secreted by various excitants, such as histamine, pilocarpine, methylguanidine, arginine, etc. all caused the flow of gastric juice when injected intravenously. Further he (1931) has made pharmacological investigations of gastric juices secreted under various conditions, and has obtained the following results: The gastric juice secreted by histamine injection shows histamine-like actions on the respiration, blood pressure, isolated intestine and uterus of rabbit, while gastric juices secreted by sham feeding or by meat feeding are generally inactive, though the latter sometimes show a slight exciting action on the isolated loop of intestine of rabbit. On the other hand, he has confirmed in his chemical investigations that when the dog's stomach was perfused with oxygenated blood containing histamine for some time, one part of the histamine appeared in the gastric juice, which result agreed with the results of his pharmacological studies. Such chemical

investigations have been made successfully with alanine (Matsuo-oka, 1933) and leucine (Ikebe, 1933), which are excitants of the flow of gastric juice. A few years ago Ikeyama (1932) isolated the bases from the gastric juice and Inoue (1929) proved the amino-acids in the gastric juice as its normal component. Although the amount of these substances in the gastric juice is very small, their existence in it is an important fact from the point of view of gastric secretion, for they are excitants of the flow of gastric juice. From these results it seems to me unnecessary to hypothesize especially a substance such as gastrine,—the nature of which is unknown,—if the consideration that the excitants themselves are secreted in the gastric juice at the time of stimulating the gastric secretion, is accepted. To confirm this opinion on the basis of further experimental evidence, pharmacological investigations of gastric juices which were secreted by various excitants, were performed according to my present report.

EXPERIMENTAL METHODS.

To collect the pure gastric juice Pawlow's miniature stomach in dogs weighing from 15 kg. to 20 kg. was employed and in order to test the pharmacological effects the following methods were selected: 1) In the case of isolated heart of frog (*esculenta*), Straub's method was employed and as the perfusing fluid, 1 cc. Ringer solution was used. 2) In the case of isolated intestine and uterus of rabbit, Magnus's apparatus was employed and as the perfusing fluid, 50 cc. of Locke solution was used. 3) Also in the case of isolated m. gastrochemius of frog (*esculenta*), Magnus's apparatus was employed and the muscle was suspended in 50 cc. Ringer solution. In all cases except the case of choline which was treated in another way, the gastric juice was neutralized with sodium carbonate and applied directly to the pharmacological tests.

EXPERIMENTAL RESULTS.

I. Action of the gastric juice secreted by sham feeding.

The pharmacological actions of the gastric juice secreted by sham feeding was investigated repeatedly as control with the fol-

lowing doses: in the case of the isolated frog heart, 0.2–0.3 cc., in the case of the isolated rabbit intestine, 3–4 cc. and in the case of the isolated rabbit uterus, 0.5–1.0 cc. The gastric juice secreted by sham feeding was generally without effects on the isolated frog heart, isolated rabbit intestine and isolated rabbit uterus.

II. Action of the gastric juice secreted by histamine injection.

The gastric juice secreted by subcutaneous injection of 4 mg histamine “Grübler” (0.2% 2 cc.) was used in these experiments.

A. Action on the isolated rabbit intestine.

2–3 cc. of this gastric juice caused usually a marked increase of the tonus or a marked increase of the amplitude of the pendulum movements, and these stimulant actions were abolished to

Fig. 1. isolated rabbit intestine.



↑ 1 2 cc. gastric juice secreted by histamine injection.

↑ 2 0.0005% atropine sulphate.

some extent by 0.0005% atropine (Fig. 1). On the contrary, in experiments in which 0.0005% atropine was added previously, it produced still an increase of the tonus or increase of the amplitude of the pendulum movements. The action of histamine on the isolated intestine was studied for the first time by Dale and Laidlaw (1911), who stated that contractions induced by histamine were not relaxed by

the addition of atropine. According to the recent experiment by Bernheim (1931) on the intestines of guinea pigs, however, when the ratio of the amount of histamine to atropine is smaller than 1:1, the atropine produces a definite decrease in the height of contractions. In my own experiment on the isolated rabbit intestine, the tonus or the amplitude of the pendulum movements, which was increased by 0.0001% histamine, was distinctly in-

fluenced by 0.0005% atropine.

B. Action on the isolated rabbit uterus.

0.5–1.0 cc. of this gastric juice caused usually a marked increase of the tonus and a decrease of the amplitude of the contractions, which were not abolished by 0.001% atropine or by 0.0005% ergotamine (Fig. 2). On the contrary, in experiments in which 0.001% atropine or 0.0005% ergotamine was added

Fig. 2. isolated rabbit uterus



↑₁ 1 cc. gastric juice secreted by histamine injection.

↑₂ 0.001% atropine sulphate.

↑₃ 0.0005% ergotamine tartarate.

previously, it produced still a marked tonus increase with a decrease of the amplitude of the contractions. Therefore the stimulant action of this gastric juice on the isolated rabbit uterus is to be attributed to a direct action on the muscle. The action of histamine on the isolated uterus was studied already by Dale and Laidlaw (1911), who stated that contractions induced by histamine on the isolated uterus of cat were not relaxed by the addition of atropine. Recently this has been reinvestigated by

Yoshida (1931), who has observed that increase of tonus and decrease of amplitude of contractions, which were caused by histamine on the isolated rabbit uterus, were not abolished by atropine or ergotamine. Also in my own experiment on the isolated rabbit uterus, atropine or ergotamine did not cause a remarkable influence on the stimulant action of histamine.

From these experiments on the isolated intestine and uterus of rabbit, it is highly probable that the gastric juice secreted by histamine injection contains histamine.

III. Pharmacological proof of the existence of choline in the gastric juice secreted by choline injection.

The gastric juice secreted by intravenous injection of 0.5 g. choline chloride (2.5% 20 cc.) was used in these experiments. Since this gastric juice itself was inactive on the isolated frog heart and isolated rabbit intestine, it was treated by means of Guggenheim's method (1916), by which we are able to prove the choline in liquids of the body, as follows:

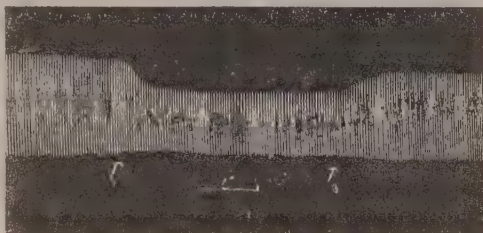
2 cc. of this gastric juice neutralized with sodium carbonate was taken in test tube and so much glass sand that all the amount of the fluid was absorbed, was added. The tube was heated in drying oven at 100°C. for a long time, and finally dried carefully in vacuum exsiccator. 1 cc. of acethylchloride was added in the tube, then it was closed by melting and heated in boiling water bath for an hour. After the perfect cooling of the water bath the tube was taken up, pinched off with forceps and the excess of the acethylchloride evaporated in water bath.—Under such treatments we are able to obtain the acethyl-ester of choline, that is, acethylcholine, pharmacological action of which is stronger than that of choline itself, if choline exists. After the cooling, the contents of the tube was taken up with 10 cc. of physiological salt-solution, neutralized with sodium carbonate and the fluid thus obtained was applied to the pharmacological tests.

A. Action on the isolated frog heart.

0.1–0.2 cc. of this fluid caused usually a remarkable decrease

of the amplitude of the heart beats, which continued until Ringer solution was changed. It is well known that acetylcholine causes a depression of the heart beats by activating the parasympathetic nerves. So I observed the effect of atropine, which is considered to be the substance that paralyzes the parasympathetic nerves, in a series of experiments. Treatment with 0.001% atropine completely inhibited the action of this fluid (Fig. 3). On the contrary, in experiments in which 0.001% atropine was added previously, it did not produce any decrease of the amplitude of the heart beats. Control investigations, in which gastric juice secreted by sham feeding was used, resulted negative under the same conditions.

Fig. 3. isolated frog heart.

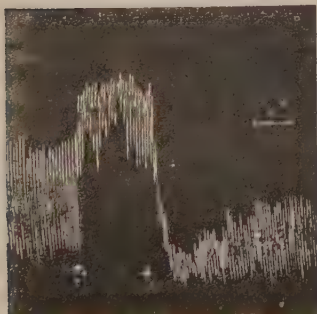


↑ 1 0.1 cc. fluid obtained from gastric juice which was secreted by choline injection.

↑ 2 0.001% atropine sulphate.

B. Action on the isolated rabbit intestine.

Fig. 4. isolated rabbit intestine.



↑ 1 10 cc. fluid obtained from gastric juice which was secreted by choline injection.

↑ 2 0.0005% atropine sulphate.

8–10 cc. of this fluid caused usually a remarkable tonus increase with a decrease of the amplitude of the pendulum movements. It is well known that acetylcholine excites the intestinal motility by activating the parasympathetic nerves. So I observed the effect of atropine which paralyzes the parasympathetic nerves, as already mentioned, in a series of experiments. Treatment with 0.0005% atropine completely inhibited the action of this fluid (Fig. 4). On the contrary, in experiments in which 0.0005% atropine was added previous-

ly, it did not cause any change in the tonus and pendulum movements.

Control investigations in which gastric juice secreted by sham feeding was used, resulted negative under the same conditions. From these experiments on the isolated frog heart and isolated rabbit intestine, it is highly probable that the gastric juice secreted by choline injection contains choline.

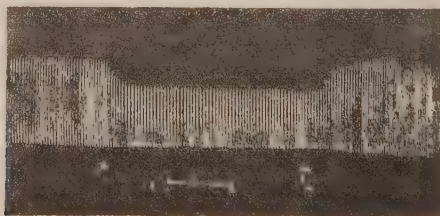
IV. Action of the gastric juice secreted by muscarine injection.

The gastric juice secreted by subcutaneous injection of 15 mg artificial muscarine "Grübler" (1% 1.5 cc.) was used in these experiments.

A. Action on the isolated frog heart.

0.1–0.2 cc. of this gastric juice caused usually a marked depression of the heart beats, which was abolished by 0.001% atropine (Fig. 5). On the contrary, in experiments in which 0.001% atropine was added previously, it did not cause any marked variation in the heart beats. It is well known that muscarine causes the depression of the heart beats, which is abolished by atropine.

Fig. 5. isolated frog heart.



↑₁ 0.2 cc. gastric juice secreted by muscarine injection.

↑₂ 0.001% atropine sulphate.

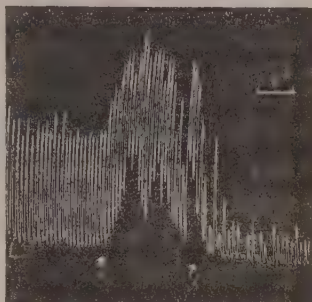
B. Action on the isolated rabbit intestine.

3–4 cc. of this gastric juice produced usually an increase of the tonus or of the amplitude of the pendulum movements, although

it was in most cases of short duration. The exciting actions of this gastric juice were abolished by 0.0005% atropine (Fig. 6). On the contrary, in experiments in which 0.0005% atropine was added previously, it did not cause any change in the tonus or in the pendulum movements. It is well known that muscarine stimulates the intestinal motility, and the antagonism between muscarine and atropine exists also in this case.

From these experiments on the isolated frog heart and isolated rabbit intestine, it is highly probable that the gastric juice secreted by muscarine injection contains muscarine.

Fig. 6. isolated rabbit intestine.



↑₁ 4 cc. gastric juice secreted by muscarine injection.

↑₂ 0.0005% atropine sulphate.

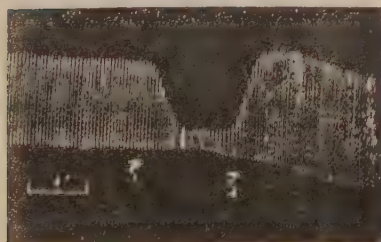
V. Action of the gastric juice secreted by neurine injection.

The gastric juice secreted by subcutaneous injection of 0.5 g. neurine bromide (2.5% 20 cc.) was used in these experiments.

A. Action on the isolated frog heart.

0.2–0.3 cc. of this gastric juice caused usually a striking depression of the heart beats, which was completely abolished by

Fig. 7. isolated frog heart.



↑₁ 0.3 cc. gastric juice secreted by neurine injection.

↑₂ 0.001% atropine sulphate.

0.001% atropine (Fig. 7). On the contrary, in experiments in which 0.001% atropine was added previously, it produced no remarkable variation in the heart beats. Descriptions about the action of neurine on the isolated frog heart are very rare in literature. According to Trendelenburg's experiment (1923) on the isolated esculenta heart,

0.2–1.0% neurine chloride causes in rare cases diastolic standstill which is abolished partly by atropine. But in my own experiment on the isolated frog heart, 0.001% neurine bromide caused already the diastolic standstill which was perfectly abolished by 0.001% atropine.

B. Action on the isolated rabbit intestine.

3–4 cc. of this gastric juice caused usually an increase of the tonus or of the amplitude of the pendulum movements, which was abolished by 0.0005% atropine (Fig. 8). On the contrary, in experiments in which 0.0005% atropine was added previously, it caused no change in the tonus or in the pendulum movements. Descriptions about the action of neurine on the isolated intestine are also very rare in literature. According to my own experiment on the isolated rabbit intestine, 0.001% neurine bromide caused the tonic state which was abolished perfectly by atropine. In lower concentration as 0.00001% it caused an increase of the amplitude of the pendulum movements, which was, of course, abolished by atropine.

Fig. 8. isolated rabbit intestine.



↑₁ 4 cc. gastric juice secreted by neurine injection.

↑₂ 0.0005% atropine sulphate.

From these experiments on the isolated frog heart and isolated rabbit intestine, it is highly probable that the gastric juice secreted by neurine injection contains neurine.

VI. Action of the gastric juice secreted by pilocarpine injection.

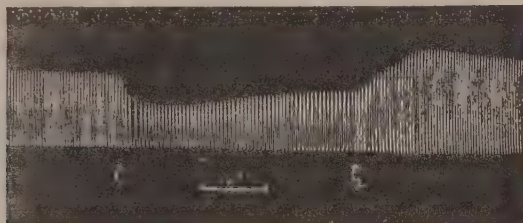
The gastric juice secreted by subcutaneous injection of 10 mg pilocarpine hydrochloride (1% 1 cc.) was used in these experiments.

A. Action on the isolated frog heart.

0.3–0.4 cc. of this gastric juice caused usually a marked depression of the heart beats, which was abolished perfectly by

0.001% atropine (Fig. 9). On the contrary, in experiments in which 0.001% atropine was added previously, it did not cause any

Fig. 9. isolated frog heart.



- ↑₁ 0.3 cc. gastric juice secreted by pilocarpine injection.
 ↑₂ 0.001% atropine sulphate.

marked change in the heart beats. It is well known that pilocarpine causes a depression of the heart beats, which is abolished by atropine.

Fig. 10. isolated rabbit intestine.



- ↑₁ 2 cc. gastric juice secreted by pilocarpine injection.
 ↑₂ 0.0005% atropine sulphate.

B. Action on the isolated rabbit intestine.

2-3 cc. of this gastric juice caused usually a striking increase of the tonus, which was abolished perfectly by 0.0005% atropine (Fig. 10). On the contrary, in experiments in which 0.005% atropine was added previously, it did not cause any change in the tonus or in the pendulum movements. It is well known that pilocarpine stimulates the intestinal motility, and the antagonism between pilocarpine and atropine exists also in this case.

From these experiments on the isolated frog heart and isolated rabbit intestine, it is highly probable that the gastric juice secreted by pilocarpine injection contains pilocarpine.

*VII. Action of the gastric juice secreted by
physostigmine injection.*

The gastric juice secreted by subcutaneous injection of 5 mg physostigmine salicylate (0.5% 1 cc.) was used in these experiments.

A. Action on the isolated frog heart.

0.2–0.3 cc. of this gastric juice caused usually an increase of the amplitude of the heart beats, but the slowing down of this frequency which is caused by the stimulation of the parasympathetic nerves was not observed (Fig. 11). It is well known that physostigmine stimulates the heart muscle.

Fig. 11. isolated frog heart.

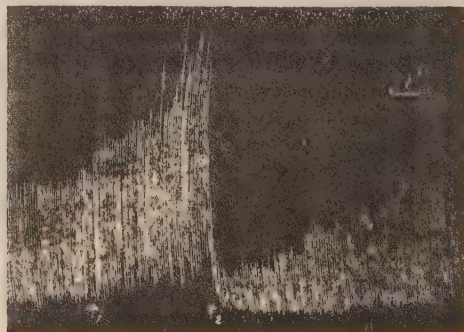


↑ 0.2 cc. gastric juice secreted by physostigmine injection.

B. Action on the isolated rabbit intestine.

3–4 cc. of this gastric juice caused usually a marked increase of the tonus with a slight increase of the amplitude of the pendulum movements, and this exciting action was inhibited by 0.0005% atropine (Fig. 12). On the contrary, in experiments in which 0.0005% atropine was added previously, it did not cause

Fig. 12. isolated rabbit intestine.



↑, 3 cc. gastric juice secreted by physostigmine injection.

↑, 0.0005% atropine sulphate.

any marked change in the tonus and in the pendulum movements. It is well known that physostigmine stimulates the intestinal motility, and the antagonism between physostigmine and atropine exists in this case to some extent.

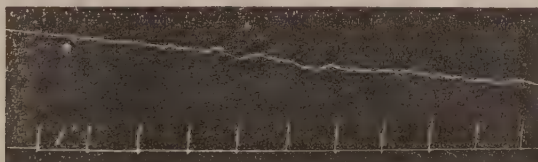
From these experiments on the isolated frog heart and isolated rabbit intestine, it is highly probable that the gastric juice secreted by physostigmine injection contains physostigmine.

VIII. Action of the gastric juice secreted by methylguanidine injection on the isolated m. gastrocnemius of frog.

The gastric juice secreted by intravenous injection of 0.5 g. methylguanidine nitrate (2.5% 20 cc.) was used in this experiment.

7-8 cc. of this gastric juice caused usually a muscular twitching (Fig. 13). In the preparations which were suspended in 0.1%

Fig. 13. Isolated m. gastrocnemius of frog.



↑ 8 cc. gastric juice secreted by methylguanidine injection.

curarine-Ringer solution, the addition of this gastric juice caused no muscular twitching. It is well known that methylguanidine causes a twitching of skeleton muscle of frog, which is influenced antagonistically by curarine.

Control investigation in which gastric juice secreted by meat feeding was used, resulted negative under the same conditions.

From these experiments, it is highly probable that the gastric juice secreted by methylguanidine injection contains methylguanidine.

DISCUSSION.

There is no doubt that a substance which excites the flow of gastric juice is present in the gastric juice. (Frouin 1905, Eisenhardt 1910, Yoshida 1930, Shimizu and Matsui 1931,

Sugishima 1932). According to Matsui (1931), this substance in the gastric juice is different from histamine or gastrine or extract of gastric mucous membrane. But in my present experiments it appeared that the gastric juice secreted by histamine injection showed histamine-like actions on the isolated intestine or uterus of rabbit, and the actions of gastric juices secreted by injection of parasympathomimetic drugs, such as muscarine, neurine, pilocarpine, physostigmine on the isolated frog heart or isolated rabbit intestine were generally similar to those of the parasympathomimetic drugs themselves, and further the choline was proved by means of Guggenheim's method in the gastric juice which was obtained by choline injection. These experiments, moreover, were extended to the methylguanidine with the same result; that is, the gastric juice secreted by methylguanidine injection showed methylguanidine-like action on the isolated m. gastrocnemius of frog. Considering these results, it is highly probable that the active substance in the gastric juice will be various according to the conditions under which the gastric juice is secreted; in other words, every excitant will be excreted into the stomach together with the gastric juice. The existence of amino-acids or bases in the gastric juice and the through-blooding investigations support this our view on gastric secretion. Therefore, if the active substance in the gastric juice may be considered as gastrine,—this consideration is not at all unrational as was already mentioned before—the gastrine will probably be not a unitary substance, but histamine, choline, neurine, methylguanidine, most amino-acids, etc. or a mixture of these substances, and its components will be various according to the sort of food or the conditions of the gastric mucous membrane.

SUMMARY.

1. The gastric juice secreted by sham feeding has no pharmacological actions on the isolated frog heart, isolated rabbit intestine, and isolated rabbit uterus.
2. The actions of the gastric juice secreted by histamine injection on the isolated intestine and uterus of rabbit, are similar

to those of histamine itself.

3. The gastric juice secreted by choline injection probably contains choline.

4. The actions of the gastric juices secreted by injection of parasympathomimetic drugs, such as muscarine, neurine, pilocarpine, physostigmine on the isolated frog heart and isolated rabbit intestine, are generally similar to those of the parasympathomimetic drugs themselves.

5. The action of the gastric juice secreted by methylguanidine injection on the isolated m. gastrocnemius of the frog, is similar to that of methylguanidine itself.

I wish to express my gratitude to Professor M. Tsudji for suggesting this study and for his guidance throughout the course of my research. My thanks are due to Professor M. Akamatsu also for his help and advice in making the pharmacological tests herein reported.

REFERENCES.

- Bernheim, F. (1931): *Journ. of Pharm. and exper. Therapeutics*, **42**, 441.
- Dale, H. H. and Laidlaw, P. P. (1911): *The Journ. of Physiology*, **41**, 318.
- Edkins, J. S. (1906): *The Journ. of Physiology*, **34**, 133.
- Eisenhardt, W. (1910): *Intern. Beiträg. zu Pathol. u. Therap. d. Ernährungsstörungen*, **1**, 358.
- Frouin, M. A. (1905): *Cpt. rend. de la société de biologie*, **58**, 887.
- Guggenheim, M. and Löffler, W. (1916): *Bioch. Zeitschrift*, **74**, 208.
- Ikebe, K. (1933): *The Journ. of Biochemistry*, **17**, 275.
- Ikeyama, K. (1932): *Nagasaki Igakkai Zassi*, **10**, 773.
- Inoue, K. (1929): *Nagasaki Igakkai Zassi*, **7**, 984.
- Ivy, A. C. and Farrell, J. I. (1925): *Americ. Journ. of Physiology*, **74**, 639.
- Matsuoka, Y. (1933): *The Journ. of Biochemistry*, **17**, 267.
- Matsui, T. (1931): *The Taiwan Igakkai Zasshi*, **30**, 758.
- Shimizu, H. and Matsui, T. (1931): *The Taiwan Igakkai Zasshi*, **30**, 747.
- Sugishima, I. (1932): *The Japan. Journ. of exper. Medicine*, **16**, 415.
- Trendelenburg, P. (1923): *Heffter's Handbuch d. exper. Pharmakologie*, **1**, 607.
- Yoshida, Y. (1930): *Nagasaki Igakkai Zassi*, **8**, 869.

Yoshida, Y. (1931): Nagasaki Igakkai Zasshi, **9**, 1005.

Yoshida, Y. (1933): The Journ. of Biochemistry, **17**, 261.

THE DISTRIBUTION OF METHIONINE IN SEVERAL PROTEINS OF FEEDING-STUFFS AND CASEIN.

By

TETUO TOMIYAMA AND MINORU HANADA.

(From the Imperial Fisheries Institute, Tokyo.)

(Received for publication, December 7, 1933)

Methionine, a sulphur containing amino acid which was discovered by Müller (1921), has been found to be present in casein, egg-albumin, edestin, wool(?), gelatine(?), fibrin, protein of rice-bran, and brewery yeast, by several authors, such as Müller (1923), Odaké (1925), Du Vigneaud and Meyer (1931-1932), and Pirie (1932). Bärnstein (1932) determined the methylthiol group, characteristic of methionine, in several proteins, and calculating from the results he assumed that methionine is widely distributed in many kinds of protein. Recently, Jackson and Block (1931, 1932), T. E. Weichselbaum, M. B. Weichselbaum and Stewart (1932) reported that the methionine, like cystine, is capable of stimulating growth in albino rats subsisting on a basal diet poor in cystine.

As far as we know, this amino acid has not yet been isolated in a pure state from the proteins of feeding-stuffs such as muscle, silk-worm pupa, and soy bean. We isolated methionine in crystalline form from these feeding-stuffs and casein, and identified it by elementary analysis both of the free amino acid and of its derivatives, i.e., copper salt and α -naphthylisocyanate.

I. PREPARATION OF SAMPLE PROTEINS AND ISOLATION OF METHIONINE.

The sample proteins, from which methionine was isolated, were prepared in the following manner.

Muscle protein of sardine and whale: The minced muscle was suspended in boiling water, and an optimum amount of acetic acid

was added to precipitate the soluble protein. The coagulated part was washed with alcohol, then with ether, and finally was dried.

Protein of silk-worm pupa: The whole body of pupa, obtained from its cocoon after the silk was reeled off, was crushed and treated in the same manner as above. As the part insoluble in hot water was not removed, it followed that this sample contained some chitin besides coagulable protein.

Protein of Soy bean: Soy bean dipped in water overnight, was crushed and extracted with hot water. Milky extract freed from insoluble residue was boiled, and precipitated in the same manner as in the case of muscle protein.

Casein: Commercial preparation.

In order to isolate methionine from these proteins, Müller's method slightly modified by Odaké was adopted in the present investigation. The analytical results of the sample protein and the yield of the crystalline methionine therefrom are recorded in Table I.

TABLE I.

Sample protein	Moisture %	Ash %	Nitrogen %	Sample protein taken (g.)	Methionine found	Yield of Methionine %
Muscle protein of Sardine	12.14	1.04	13.67	200	0.897	0.45
Muscle protein of Whale	12.17	0.35	14.04	400	1.314	0.32
Protein of Silk-worm pupa	8.19	0.93	12.85	200	0.788	0.39
				200	0.615	0.31
Protein of Soy bean	10.96	2.78	12.50	400	0.286	0.07
Casein	9.80	1.42	13.38	200	0.720	0.36

II. PROPERTIES OF ISOLATED METHIONINE.

Heating in open capillary tube, the isolated crystals began to colour at 230°-240°C.; melted with simultaneous decomposition at the following temperatures.

Crystal from sardine muscle protein 267-269°C.

Crystal from whale muscle protein 267-269°C.

Crystal from the protein of silk-worm pupa	265-268°C.
Crystal from the protein of soy bean	268-269°C.
Crystal from casein	268-270°C.

All these crystals are very soluble in water, while insoluble in alcohol or ether; they form sparingly soluble copper salt as well as insoluble mercuric salt, but can be precipitated neither by phosphotungstic acid nor picric acid. Ninhydrin reaction is strongly positive, while color reactions such as biuret, millon, and nitroprussid are all negative.

III. IDENTIFICATION OF THE ISOLATED CRYSTALS.

The free amino acid crystal, isolated from the five proteins aforementioned, and its derivatives were identified by the elementary analysis.

1. Free methionine $C_5H_{11}NSO_2$.

The crystals dried at 100°C. in vacuum were subjected to the microanalysis for C, H, and N with the following results (Table II).

TABLE II.

Methionine Sample Protein	C %	H %	N %
Muscle protein of Sardine	39.82	7.65	9.13
Muscle protein of Whale	40.77	7.75	9.50
Protein of Silk-worm pupa	40.20	7.62	9.33
Protein of Soy bean	40.67	7.81	9.52
Casein	—	—	9.23
Calc. for $C_5H_{11}NSO_2$	40.23	7.43	9.39

It is easily seen from the above results that the isolated crystals are composed in the main part of methionine, though contaminated with a trace of impurity.

2. *Derivatives of methionine.*

a) *Copper salt*: This salt crystallizes out soon after the saturated solution of copper acetate is added to the concentrated aqueous solution of the free amino acid.

b) *α -Naphthylisocyanate derivative*: 0.12 cc. of α -naphthylisocyanate (Kahlbaum) is added to a solution of 0.1 g. of the free amino acid dissolved in 6.7 cc. of $n/10$ NaOH, and shaken for 2 hours. On acidifying the filtrate of the reaction mixture, a mass of white needlelike crystal forms immediately. The mixture is centrifuged to separate the crystal, which is washed several times with water, and dried to constant weight at 80–90°C. The product melted at 183–186°C., but on recrystallizing from hot 70 per cent. alcohol, it melted at 190–193°C. The yield of the first crystals of these two derivatives is shown in Table III.

TABLE III.

Applied	Copper salt (g.)	α -Naphthyl- isocyanate Derivative (g.)
0.1 g Crystal from muscle protein of Sardine	0.09	0.16
0.1 g Crystal from muscle protein of Whale	0.084	0.19
0.1 g Crystal from the protein of Silk-worm pupa	0.09	0.19
0.1 g Crystal from the protein of Soy bean	—	0.19
0.05 g " " " " " "	0.015	—
0.1 g Crystal from Casein	0.07	0.18

The two derivatives thus prepared were analyzed to determine the content of nitrogen, copper and sulphur as shown in Table IV.

From the foregoing comparison, the analytical results of these two derivatives of the amino acid isolated from five kinds of protein agree well with the theoretical value of methionine derivatives.

IV. CONTAMINATION OF METHIONINE FRACTION WITH GLUTAMIC ACID.

In most cases, methionine was isolated in relatively pure crystal by the method adopted; but in the case of protein of silk-

TABLE IV.

Derivatives	Copper salt		α -Naphthylisocyanate derivative	
	N	Cu	N	S
Sample proteins	%	%	%	%
Muscle protein of Sardine	7.80	17.69	8.84	10.36
Muscle protein of Whale	7.92	17.67	8.75	10.11
Protein of Silk-worm pupa	7.72	17.94	8.87	10.12
Protein of Soy bean	7.66	17.66	8.96	10.28
Casein	8.11	17.60	8.65	10.08
Calc. for	7.79 $\text{Cu}(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{SNO}_2)_2$	17.60	8.80 $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{SN}_2\text{O}_3$	10.28

worm pupa, it was found that the isolated fraction was largely contaminated with glutamic acid. This impurity was removed and identified by its nitrogen content and its acidity. The removal of the impurity is as follows: The mixed crystals were dissolved in a small amount of water, and methionine was precipitated by HgCl_2 ; from the filtrate, excess of the reagent was removed by H_2S , the hydrochloric acid produced was eliminated by silver oxide, the excess of which was decomposed by H_2S , and upon concentrating the filtrate, crystal amounting to 0.25 per cent. of the protein of silk-worm pupa was obtained. This crystal melted at 220°C ., and as is shown in Table V, the results of determination of acidity

TABLE V.

Nitrogen content	Sample mg.	$\text{N}_2(\text{cc.})$	Temp. ($^\circ\text{C}$.)	Press. (mm.)	N %
Method					
micro-Dumas	3.820	0.331	20.5	768.0	9.97
Van Slyke	1.00	0.17	23.0	769.0	9.65
			Calc. for $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$		9.52
Acidity	Sample mg.	cc. $n/45$ NaOH required for neutralization.		Calc. for glutamic acid from the titer (mg.)	
	5.00	1.30		4.24	
	6.53	1.86		6.08	

and of nitrogen by both the micro-Dumas method and the Van Slyke method, indicate this crystal to be glutamic acid.

Furthermore, some crystal giving strong millon reaction was obtained in the course of isolating methionine from casein hydrolysate, viz. upon concentrating, in vacuo, the solution obtained after the removal of mercury by H_2S from methionine-sublimate precipitate. This crystal melted and decomposed at $302^\circ C.$, and the analytical result showed that this was tyrosine.

4.845 mg subst.: 0.332 cc. N_2 (767 mm. at 22°)

Found 7.81%

Calc. $C_9H_{11}NO_3$ 7.74%

SUMMARY.

1. Methionine in crystalline form was isolated from the muscle protein of sardine and whale, the protein of silk-worm pupa, the protein of soy bean, and casein. The yield based on dry and ash-free protein was as follows;

Muscle protein of sardine	0.52%
Muscle protein of whale	0.37%
Protein of silk-worm pupa	0.43%
Protein of soy bean	0.08%
Casein	0.41%

2. Contrary to the result of Odaké, methionine was isolated with certainty, though in a small amount, from the protein of soy bean.

3. Although only a few kinds of protein were investigated in the present study, it might be presumed that methionine would be generally wide-spread in proteins, especially in those of animal origin.

4. It was found that the methionine crystal isolated from silk-worm pupa was largely contaminated with glutamic acid, and in the case of casein tyrosine was isolated from the methionine fraction precipitated by sublimate.

The writers wish to express their sincere thanks to Prof. Y.

Okuda of the Kyushu Imperial University, Fukuoka, for his interest which made this study possible.

REFERENCES.

- Bärnstein, H. D. (1932): *J. Biol. Chem.*, **97**, 663.
Du Vigneaud, V. and Meyer, C. E. (1931-32): *J. Biol. Chem.*, **94**, 641.
Jackson, R. W. and Block, R. J. (1931): *Science*, **74**, 414.
Jackson, R. W. and Block, R. J. (1932): *J. Biol. Chem.*, **98**, 465.
Müller, J. H. (1921): *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **18**, 14.
Müller, J. H. (1923): *J. Biol. Chem.*, **56**, 157.
Odaké, S. (1925): *Biochem. Z.*, **161**, 446.
Pirie, N. W. (1932): *Biochem. J.*, **26**, 1270.
Weichselbaum, T. E., Weichselbaum, M. B. and Stewart, C. P.
(1932): *Nature*, **129**, 795.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

IV. On an Enzyme which Catalyses the Hydrolysis of Biosynthetic Osides of Glucuronic Acid.

By

H. MASAMUNE.

(From the medico-chemical Institute of Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)

(Received for publication, December 8, 1933)

Two decades ago Sera (1913, 1914) showed that orcinol- and phloroglucinolglucuronic acids could not be hydrolysed by emulsin but is split up by chloroformwater extracts of animal organs such as liver, spleen and kidney of ox, rabbit, dog and fowl. According to the writer's experience, however, emulsin hydrolyses phloroglucinolglucuronic acid at pH 4.4 and 5.3 as well as other natural conjugated glucuronic acids, although its degree is very low. When the investigation of Sera was made, the role of hydrogen ion in enzyme action was not yet well known so that his oversight in the emulsin test was probably due to improper experimental conditions. Consequently the problem has to be reconsidered from the viewpoint of recent enzyme chemistry. The writer prepared from ox kidney an enzyme solution which hydrolyses biosynthetic osides of glucuronic acid. The tissue antolysate was treated with alcohol and the enzyme was extracted from the precipitate with water. If these manipulations are repeated once again one can obtain a solution which still contains much protein but scarcely reduces ferricyanide after being deproteized with phosphotungstic acid. The enzyme is very unstable, and, when dried up, or treated with alcohol or acetone, it lost most of its activity. Glycerol and glycerol depress its activity. Heating inactivates it more readily than does emulsin. The optimal pH in hydrolysis of biosynthetic mentholglucuronic acid lies at pH 5.3 and that of phenolglucuronic acid between 5.3 and 5.6.

It catalyses also the hydrolysis of other natural acids as β -naphthol-, borneol- and phloroglucinolglucuronic acids. Probably this enzyme may be identical with that of Sera and also with that of Röhmann (1907) which splits up mentholglucuronic acid. As all of the acids above enumerated can be split up by emulsin, they must be a kind of β -osides, and the enzyme a β -osidase. Synthetic α -mentholglucuronic acid remained intact when incubated with the enzyme solution.

Several glucosides were examined also, but not only α - but also β -glucosides were not attacked at all, with the exception that β -phenolglucoside was hydrolysed to a slight extent. In this regard, therefore, it differs much from emulsin; namely the enzyme is thus highly specific in comparison with β -glucosidase. Besides, the enzyme is much more unstable than emulsin and the optimal pH is shifted from that of emulsin which lies at about 4. For these reasons, it might be justifiable to conclude that this is a different enzyme from β -glucosidase. The author denominates it " β -glucuronosidase".

EXPERIMENTS.

I. Preparation of the enzyme solution.

An ox kidney is removed from fat and minced by means of a masticator. The pulp thus obtained is mixed with double weight of 0.85% NaCl solution and then increased with toluene in proportion of 0.05 cc. to 1 cc. of the mixture. It is kept in an incubator at 38°C. for 3 days with occasional shaking. The antoly-sate is centrifuged. As the supernatant liquid is still turbid, it is shaken with diatomaceous earth (1.5 gm. per 10 cc.) and centrifuged again. The clear liquid is poured into three volumes of 95% alcohol under shaking and centrifuged as quickly as possible, whereupon the centrifugate is pressed without delay between clean papers. It is then ground with five to ten times weight of water and placed in the ice chest over night, after the addition of a little toluene.

In the second step, the suspension is added to with 1 n H_2SO_4

solution (0.01–0.02 cc. H_2SO_4 per 1 cc. suspension) in order to precipitate some of the protein dissolved and centrifuged. The enzyme is let fall down from the supernatant liquid by the addition of three volumes of absolute alcohol and separated by quick centrifugalization. The liquid is poured off completely and then put into a vacuum dessicator (<3 mm. Hg) with P_2O_5 . After 8 minutes the enzyme is extracted with water of one to half volume that of the suspension started with in this step. Extraction is carried out by mixing well and letting stand for longer than 30 minutes in the air. The denatured protein is separated on a filter or by means of a centrifuge. The enzyme solution obtained is clear and colourless or tinged faintly yellow.

Note.

a) To measure the enzyme contents of the extracts during preparation, they were neutralized, when acid, with 0.1–2 n. NaOH solution and those of the later stages were diluted to the volume corresponding to the autolysate. They were mixed with one volume of the citrate buffer solution of pH 5.3 (Walbun), half volume of mentholglucuronic acid solution and one drop of toluene. (The mentholglucuronic acid solution here used was prepared by dissolving 250 mg in 7.05 cc. of 0.1 n NaOH and diluting to 10 cc. This solution is applied in all of the following experiments with this acid, if not specially mentioned.)

The vessel was stoppered and placed in the thermostat at 38°C. and after the lapse of 5 hours the mixture was deproteinized and the freed menthol was determined by the method for blood analysis (Masamune 1933). The final enzyme solution was found to contain most of the enzyme which was present in the liquid after treatment with diatomaceous earth.

b) The quantity of diatomaceous earth needed for clearing the autolysate amounted at least to 1.4 gm. per 10 cc. of the latter.

c) Alcohol and particularly acetone are toxic to the enzyme.

In preparation, therefore, the period for which the enzyme is in contact with alcohol must be shortened as much as possible. Absolute alcohol of equal volume is insufficient to precipitate all the

enzyme from the extract while more than 6 volumes destroy it readily. When two to four volumes are applied and the time is shortened to 20 minutes, over 90% of active enzyme is regained by the following extraction.

d) The enzyme content differs appreciably from one kidney to another.

e) When the enzyme precipitate is dried up, the activity disappears very rapidly.

f) *Duration of autolysis:* The yield of the enzyme reaches the maximum usually after the expiration of 72 hours from the commencement of incubation, and then it decreases gradually.

g) CaCO_3 absorbs the enzyme.

h) When the enzyme solution was filtered through a Bechhold's ultrafilter (3%), the filtrate was rich in protein but the menthol set free for 3 hours amounted only to about 60% of that freed by the original enzyme solution. It seems from this result that the enzyme is of fairly big molecule.

i) The activity of the enzyme solution diminishes day by day, even when it is kept in the ice chest. Keeping the solution at pH 5.3 protects the enzyme to some extent from destruction.

k) After being deproteinized with phosphotungstic acid (confer the paragraph of quantitative relation in section II) the enzyme solution can reduce ferrieyanide but slightly. 1 cc. filtrate which corresponds to 0.5 cc. of the solution reduces less than 0.1 cc. of $n/200$ ferrieyanide solution.

II. Is the chemical change of mentholglucuronic acid caused by the enzyme solution confined to hydrolysis?

It is most probable that the solution might contain many enzymes besides the one under investigation. It has, therefore, to be proved whether or not any further decomposition of the hydrolysis products occurs.

The mixture of mentholglucuronic acid and the enzyme solution comes to smell of menthol in a short time at pH 5.3 and 38°C . and the distillate of the alcoholic filtrate gives a colour reaction of free menthol with dimethylaminobenzaldehyde and also with

vanillin. In order to test the free glucuronic acid, on the other hand, the reaction mixture was neutralized with NaOH solution, deproteinized with phosphotungstic acid, and then the filtrate was added to with 4 *N*. HCl in the proportion of 0.5 cc. to 10 cc. of the former, and extracted with ether, using a Kumaga-Suto's extraction apparatus, until no more dimethylaminobenzyldehyde reaction was observed. It was shaken with BaCO₃ to remove phosphotungstic acid and filtered after being aerated. This last filtrate showed naphthoresorinol reaction (Neuberg and Sanyoshi) of glucuronic acid and phloroglucinol reaction (Wheeler and Tollens) of pentose.

A typical example of the quantitative determination was as follows: 6 cc. of the enzyme solution was mixed with the mentholglucuronic acid solution and the citrate buffer (pH. 5.3) as described in I) and the whole mixture was placed in the thermostat at 38°C. after the addition of two drops of toluene. After the lapse of 8 hours, it was cooled and 5 cc. of the mixture was neutralized with 1 cc. 0.12 *N* NaOH deproteinized with 4 cc. of 5.3% phosphotungstic acid and filtered. 1 cc. of the filtrate was made up to 12 cc. with water and determined on the reduction power according to the method described by the author (Masamune 1933). The blanc test was carried out by replacing mentholglucuronic acid solution with water. The amount of *n*/200 ferricyanide solution reduced was 1.63 cc., which corresponds to 8.73 mg of free glucuronic acid.

Next, another 5 cc. portion of the reaction mixture was taken out, deproteinized with 2 volumes of absolute alcohol and the free menthol was determined on 3 cc. of the filtrate. The result indicated that in the whole mixture, the free menthol amounted to 6.38 mg. Finally 2 cc. from the remaining mixture were made up to 10 cc. with alcohol, filtered and the mentholglucuronic acid was determined with 1 cc. filtrate. 30.6 mg conjugated glucuronic acid in terms of glucuronic acid remained unaltered in the total.

As 7.5 mg ($=25 \times 3$) mentholglucuronic acid which correspond to 39.5 mg ($=75 \times 194/368$) glucuronic acid were taken for this experiment, 8.9 mg ($=39.5 - 30.6$) glucuronic acid is to be found in a

free state. In analysis 8.7 mg was actually found. Menthol which is to combine with 8.9 mg glucuronic acid amounts to 7.2 mg ($= 8.9 \times 156/194$). The quantity of free menthol observed was 6.4 mg, a little less than the calculated but nearly within the experimental error. Consequently no enzyme which causes the further decomposition of the hydrolysis products appears to be present.

The adequacy of phosphotungstic acid as a deproteinizing reagent¹⁾ in this case is shown in table I.

A measured quantity of the glucuronic acid was added to a mixture of the enzyme and the buffer solution and deproteinized by following the procedures in the experiment above. No protein was detected in the filtrate by the addition of trichloroacetic acid. 1 cc. filtrate was used for determination of the reduction power and the acid was found recovered quantitatively. The effects of glycol and glycerol were examined, but they did not spoil the analysis. The experiment with glucose at various pH was also made by replacing acid solution with glucose solution. It gave quite satisfactory results.

Experiments with emulsin (E. Merck) instead of the present enzyme are also given in the table. Neither glucuronic acid nor glucose could be recovered quantitatively more than to about 90%.

III. Optimal pH.

2 cc. of the enzyme solution were mixed with the buffer solution at various pH and the mentholglucuronic acid or phenolglucuronic acid solution in the proportion above described. Phenolglucuronic acid solution was prepared by dissolving 183 mg acid in 7.05 cc. 0.1 N NaOH and made up to 10 cc. with water. In all the following experiments with phenolglucuronic acid, this solution was applied if not specially mentioned.

As buffer solutions, citrate (Walbum, pH 1.2–6.7) phosphate (Sørensen, pH 7.7) and glycocoll mixtures (Sørensen pH 8.6–

1) Cadmium hydroxide (Fujita and Iwate's method) and alcohol are improper as the deproteinizing agents. Particularly in the case of the former, most glucuronic acid is retained with the coagulum.

TABLE I.
 4 cc. of 5.3% phosphotungstic acid sol. was used for deproteinizing and 1 cc. filtrate was taken for analysis.

Enzyme sol. (cc)	Buffer sol. (Citrate, Walburn) (cc)	Glucuronic acid sol. (cc)	Glucose sol. (cc)	Water (cc)	Glycol (cc)	Glycerol (cc)	NaOH sol. used for neutrali- zation (cc)	n/200 Ferri- cyanide sol. (cc)	Recovered (mg)	Recovered (%)
2	[pH 5.3] 2	[0.49% sol] 1	—	—	—	—	[0.12 n] 1	2.66	475	96.9
"	"	0.5	—	0.5	—	—	"	1.33	239	96.7
"	"	0.1	—	0.9	—	—	"	0.32	61	106
1 (double conc. sol)	1 (double conc. sol)	[0.316% sol] 1	—	—	2	—	"	1.79	320	101.2
1 (double conc. sol)	1 (double conc. sol)	[0.407% sol] 1	—	—	—	2	"	2.24	400	98.3
2	2 [pH 4]	—	[0.517% sol.] 1	—	—	—	"	3.02	50.3	97.3
"	"	—	[527% sol.] 1	—	—	—	[0.2 n] 1	3.13	522	99.1
Emulsin experiment.										
Emulsin sol (40 mg in 1 cc)	[pH 4]	[0.500% sol.]	—	1	—	—	"	2.56	457	91.4
1	2	1	—	1.5	—	—	"	1.24	221	88.4
"	"	0.5	—	1.9	—	—	"	0.25	45	90
"	"	0.1	[0.517% sol.] 1	1	—	—	[0.12 n] 1	2.8	467	90.8
"	[pH 5.3] 2	—	[0.5% sol.] 0.5	1.5	—	—	"	1.3	217	86.8
"	"	—	0.1	1.9	—	—	"	0.26	43	86
"	[pH 4] 2	—	[0.5% sol.] 1	1	—	—	[0.2 n] 1	2.86	477	92.8
"	"	—	0.5	1.5	—	—	"	1.39	232	92.8
"	"	—	0.1	1.9	—	—	"	0.27	45	90

9.7) were applied. In the case of mentholglucuronic acid, the reaction mixture was kept in a thermostat at 38°C. for 8 hours, deproteinized by the addition of absolute alcohol up to 15 cc. and the freed menthol was determined according to the method adopted for menthol in tissue (Masamune 1933). The reaction mixture with phenolglucuronic acid were placed in an incubator at 37°C. and after the expiration of 12 hours from the commencement, it was neutralized with an equivalent amount of NaOH. (0.1 and 0.2 NaOH were used), made up to 6 cc. with water, and finally deproteinized with phosphotungstic acid as above described. 0.5 cc. of the filtrate, after being extracted with ether for 1 hour (confer 6) was taken for analysis. As table II. shows, the optimal pH lies for mentholglucuronic acid at 5.3 and for phenolglucuronic acid between 5.3 and 5.6. The enzyme solutions applied in both cases were from different sources.

IV. Optimal pH of emulsin when it acts on natural menthol- and phenolglucuronic acids.

In case of mentholglucuronic acid, 1 cc. of the acid sol, 2 cc. of the buffer solution (Walbum) at various pH, 0.5 cc. of glycerol and 1 cc. of the emulsin solution (4%) were mixed together and, for comparison on the other hand, mixtures consisting of 0.5 cc. glycerol solution of β -mentholglucoside (4.56%) 1.5 cc. water, 2 cc. buffer sol. and 1 cc. of emulsin sol. were made. In case of phenolglucuronic acid, 2 cc. of the acid solution (1.83/2%) were mixed with 2 cc. of buffer and 1 cc. of emulsin solutions, and the mixture for comparison was made by replacing the phenolglucuronic acid sol. with β -phenolglucoside solution (1.74/2%). All were placed in the incubator at 37°, after addition of one drop of toluene. After 12 hours, they were neutralized and deproteinized as described and the reduction power was determined directly with the filtrate or after being extracted with ether. Table III. shows that the optimal pH of emulsin in splitting these conjugated glucuronic acids lies around pH 4. The hydrolysis degree of these acids is lower than that of the corresponding glucosides.

TABLE II.

enzyme sol. 2 cc. buffer solution. 2 cc. conjugated glucuronic acid solution 1 cc.													
pH	1.2	2.3	3.7	4.7	5.0	5.3	5.6	6.0	6.3	6.7	7.7	8.6	9.7
menthol set free from 25 mg of metho glucuronic acid (mg)	0	0.34	0.69	1.60	1.71	2.24	2.01	1.54	0.78	0.39	0.36	trace	0
(incubation 38°C. 8 h)													
glucuronic acid set free from 18.3 mg of phenol- glucuronic acid (mg)			1.25	2.18	2.43	2.64	2.64	1.07	0.50				
(incubation 37° 12 h)													

TABLE III.

pH		2.3	4.0	4.4	5.3	6.0	6.7
Glucuronic acid set free from men- tholglucuronic acid	filtrate taken for analysis	1	"	"	"	"	"
	quantity in mg	1.64	1.75	1.63	0.84	0.23	0.25
Glucose set free from β - mentholglucoside	filtrate taken for analysis	0.5	"	"	"	"	"
	quantity in mg	3.5	10.06	9.0	9.17	—	8.87
Glucuronic acid set free from phenolglucuronic acid	filtrate take for analysis	0.3	"	"	"	"	"
	quantity in mg	0.89	1.12	0.95	0.36	0.48	0.48
Glucose set free from β - phenolglucoside	filtrate taken for analysis	0.3	"	"	"	"	"
	quantity in mg	7.05	9.11	8.72	8.5	—	—

V. *Heat inactivation.*

2 cc. of the enzyme solution were heated in a stoppered tube at various temperatures for 10 minutes and quickly cooled in ice water. Thereafter its power of hydrolysis was determined just as was described in the mentholglucuronic acid experiment in III). The pH was kept at 5.3. The enzyme was completely destroyed at 70°C. (table IV).

TABLE IV.

{ Enzyme sol. 2 cc.
 { Buffer sol (Walbum, pH 5.3) 2 cc.
 { Mentholglucuronic acid sol. 1 cc.

Incubation 8 h. at 38°C.

	Not heated	Heated at		
		50°C	70°C	90°C
Menthol set free (mg.)	1.37	1.24	0	0

TABLE V.

Emulsin solution (20 mg in 1 cc)	2 cc.
Citrate buffer solution (Walbum pH 4.0)	2 cc.
Conj. glucuronic acid or glucoside sol.	1 cc.

Incubation 14 h. at 38°C.

	Not heated	Heated at				
		50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
Glucuronic acid set free from mentholglucuronic acid (mg)	4.23	2.13	—	0.82	0.75	0.46
Glucose set free from β -methylglucoside (13.8 mg) (mg)	11.06	—	10.5 mg	7.27	0.13	0

Compared with the enzyme under investigation, emulsin is much more stable as table V. shows. When heated at 90°C., the β -methylglucoside could not be hydrolysed at all, while menthol was still set free to a small extent. (This result suggests that there might exist a special enzyme in the emulsin specimen which hydrolyses biosynthetic conj. glucuronic acids.)

In this experiment, 2 cc. emulsin sol (2.0%) were treated in similar manner as above. As the substrates mentholglucuronic acid and β -methylglucoside (1.38%) were used. pH was kept at 4.0 and incubation was extended to 14 hours.

VI. Does the enzyme catalyse the hydrolysis of other biosynthetic osides of glucuronic acid?

Experiments were tried with borneol- and β -naphtholglucuronic acids, and for comparison those with menthol and phenolglucuronic acids were repeated with the same enzyme solution. Phloroglucinolglucuronic acid was also examined but with a different enzyme solution. For measuring the hydrolysis degree of borneolglucuronic acid, no preliminary manipulation is necessary if the non-protein filtrate is determined on the reduction power as described in the experiment with mentholglucuronic acid. But when the β -naphthol or phenol compound is applied, ferricyanide is reduced not only by the free glucuronic acid but

also by these aromatic alcohols. In order to devise a method for determining the reduction power of the glucuronic acid alone the following experiment was made:

1 cc. of the solution of β -naphthol (recrystallized from alcohol by addition of water) in ether (purified) (10 mg in 1 cc.) was pipetted into a tube. Ether was expelled by slight heating; then the residue was added to with 2 cc. citrate buffer (pH 5.3), 2 cc. water, 1 cc. enzyme solution and 1 drop of toluene according to the proportion adopted above. The vessel was kept in a thermostat at 38°C for 1 hour with frequent shaking. The mixture was then neutralized and deproteinized with phosphotungstic acid as described. The filtrate was transferred into an extractor of the same size as was used for analysis of conjugated glucuronic acids, and extracted with 20 cc. of purified ether, by letting the latter circulate at such a speed as 30-40 drops flow back in 10 seconds. In various intervals ($\frac{1}{2}$, 1 and 2 hours), the extraction was stopped and ether was removed by bubbling air and the reduction power was finally determined with this liquid. The blank test was carried out without β -naphthol. After the extraction for $\frac{1}{2}$ hour already no more β -naphthol remained. 1 cc. of the filtrate which was not extracted reduced 2.56 cc. of $n/200$ ferricyanide solution. The above procedures were followed also with phenol. In this case 2 cc. phenol solution containing 11.16 mg was applied instead of β -naphthol and 2 cc. water and the mixture was not placed in the thermostat in advance.

Phenol was also extracted perfectly in $\frac{1}{2}$ h. 1 cc. of the non-protein filtrate without extraction reduced 2.10 cc. of $n/200$ ferricyanide solution.

In regard to phloroglucinolglucuronic acid, not only phloroglucinol but also the conjugated acid itself reduced ferricyanide. The former is easily soluble in ether, but the latter not. Hence, the author tried to extract phloroglucinol set free into ether and its reduction power was made use of for measuring the hydrolysis. The reduction power of phloroglucinol is given in table VI. and fig. 1.

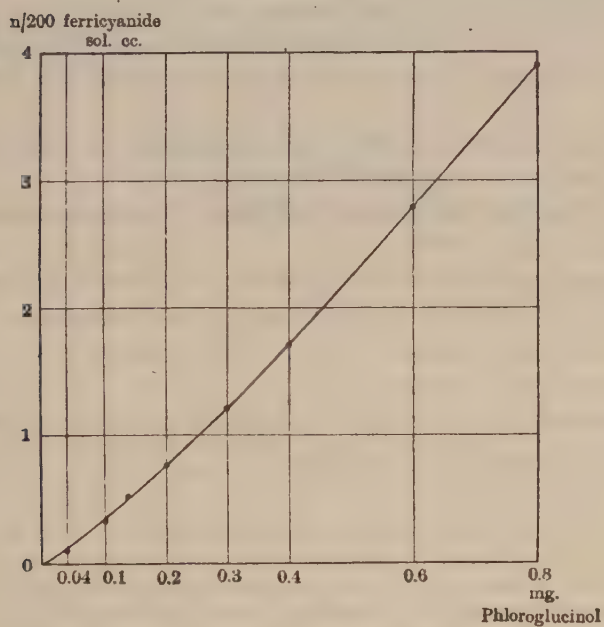
A measured quantity (0.1-0.4 cc.) of phloroglucinol solution

TABLE VI.

Air temperature: 24°C

Phloroglucinol analysed (mg.)	n/200 ferricyanide solution reduced (cc.)
0.8	3.88
0.6	2.81
0.4	1.72
0.3	1.22
0.2	0.71
0.14	0.51
0.1	0.32
0.04	0.12

Fig. 1.

 Reduction Power of Phloroglucinol on Ferricyanide at
air temperature (24°C)


(0.2 mg%) was put into a big test tube, made up to 12 cc. with water, added to with 4 cc. *n*/200 ferrieyanide sol. (Fujita and Iwatake) and let stand for exactly 2 minutes at air temperature (24°C.) Then 3 cc. of the salt mixture (Hagedorn and Jensen) and 4 cc. of 6.2% HCl were added to it and titration was made without delay using *n*/200 thiosulfate solution. The adequacy of deproteinizing with alcohol in this case and the extraction velocity of phloroglucinol were examined as follows.

A mixture of 1 cc. of 1% phloroglucinol solution, 2 cc. of the citrate buffer and 2 cc. of the enzyme sol. was deproteinized by filling absolute alcohol up to 20 cc. and 1 cc. of the non-protein filtrate was evaporated in a beaker on a bath. The residue was dissolved with 3 cc. hot water and poured into the extraction tube, with 4 cc. and finally with 3 cc. of water. At the end of $\frac{1}{2}$ and 1 hour from commencement, the extraction was stopped and ether in the lower tube was evaporated. The residue was dissolved with 3 cc. hot water and made up to 12 cc. with water and then the procedures as above mentioned were followed. In $\frac{1}{2}$ hour 90.8% and in 1 hour completely it came over into ether. In this duration no trace of phloroglucinolglucuronic acid was found extracted.

From these results, 1 hour was adopted for extraction in all cases of the three conjugated glucuronic acids.

The following solutions of conjugated glucuronic acids were prepared:

β -naphtholglucuronic acid sol.: 242 mg acid were dissolved in 7.05 cc. 0.1 *N* NaOH and made up to 10 cc. with water.

Borneolglucuronic acid sol.: 270 mg of the sodium salt were dissolved in 10 cc. water.

Phloroglucinolglucuronic acid¹⁾ sol. 244 mg of the potassium salt were dissolved in 10 cc. water.

1) Preparation of potassium phloroglucinolglucuronate: 10 rabbits were each given 2 gm phloroglucinol mixed with food. 24 hours urine (1800 cc.) were acidified, treated with sat. lead acetate sol. and filtered. The filtrate was, after being neutralized with ammonia, added to with sat. lead subacetate solution. The precipitate was collected in a Büchner funnel and washed three

The solutions of mentholglucuronic acid and phenolglucuronic acid which were used in this experiment are those already mentioned. The concentrations of these five solutions are equivalent to one another and correspond to 132 mg% glucuronic acid.

As in the previous experiments the solutions were mixed together in the ratio of 1 cc. of the acid solution, 2 cc. of the citrate buffer (pH 5.3) and 2 cc. of the enzyme solution and one drop of toluene was added to it. The mixtures were kept for 15 hours in the experiment with phloroglucinolglucuronic acid and for 14 hours in those with the other acids. As already mentioned, the enzyme sol. applied in the former case is of another source than that in the other. (Table VII.)

All of the biosynthetic conjugated glucuronic acids were hydrolysed. But the degrees differed markedly according to the aglucon. As a contrast to the experiment with phloroglucinolglucuronic acid, the hydrolysis of mentholglucuronic acid under similar conditions was observed with the same enzyme solution. 8.14 mg (61.7%) glucuronic acid was found set free against 1.33 mg from phloroglucinolglucuroine acid.

VII. *Are the biosynthetic conjugated glucuronic acids β -osides?*

The procedures in the previous experiment were followed but pH of the mixture was made 4.4 with the citrate buffer (Walbum) and emulsin (E. Merck) solution (40 mg in 2 cc.) was applied instead of the enzyme solution.

times with cooled water. The conjugated glucuronic acid was set free by passing H_2S through the suspension of the lead salt in water. PbS was separated and washed and the combined filtrate was evaporated to about 100 cc. from which hippuric acid was removed by extraction with three portions of 300 cc. ether. Thereupon the solution was neutralized with 2 n. KOH and placed in the ice chest, after being condensed in vacuo, to about 25 cc. Crystals came out very slowly. After one week, they were separated on a Büchner funnel, and washed with a little cooled water. Recrystallization was exerted from 8 cc. water and the crystals in the form of small prisms were washed and dried.

TABLE VII.

{ Enzyme solution 2 cc.
 { Citrate buffer (walbum, pH 5.3) 2 cc.
 { Conjugated glucuronic acid sol. 1 cc.

Conjugated glucuronic acid applied	Filtrate or extracted Filtrate taken for analysis (cc.)	n/200 Ferri- cyanide sol. reduced (cc.)	Glucuronic acid set free	
			(mg.)	%
Menthoglucuronic acid	2	3.38	3.02	23.1
Borneoglucuronic acid	"	1.16	1.04	7.9
β -Naphthoglucuronic acid	0.5	1.87	6.68	51
Phenoglucuronic acid	2	1.41	1.26	9.5

(Incubation 37°C. 14 hours)

Phloroglucinolglucuro- nic acid	1	0.72	1.33	15.6
Menthoglucuronic acid	0.5	2.28	8.14	61.7

Incubation 37°C. 15 hours. The enzyme solution applied in the last two cases is from a different source than in the former four.

The results are shown in table VIII. The former four acids were undoubtedly hydrolysed. As the hydrolysis degree of phloroglucinol glucuronic acid was infinitely small, the experiment was repeated with all precautions but with the same result that a distinct difference in the amount of thiosulfate used was observed invariably between the main and the blanc tests. Therefore, these conjugated glucuronic acids are β -osides. Most probably all the natural conj. glucuronic acids of oside type are of β -form.

VIII. Does the enzyme solution hydrolyse synthetic α -mentholglucuronic acid?

The solubility of α -mentholglucuronic acid (Bergmann and Wolff 1923) in water is very small and if applied as sodium salt, it precipitates out in the mixture acidified by the buffer solution.

TABLE VIII.

Emulsin sol. (2%)	2 cc.
Buffer sol. (Walbum)	2 cc.
Conjugated glucuronic acid sol.	1 cc.

Conjugated glucuronic acid	pH	Filtrate or extracted filtrate taken for analysis (cc)	n/200 Ferricyanide sol. reduced (cc)	Glucuronic acid set free	
				(mg)	(%)
Mentholglucuronic acid	4.4	1	1.98	3.54	26.8
Borneolglucuronic acid	"	"	0.18	0.32	2.4
β -Naphtholglucuronic acid	"	"	0.27	0.48	3.6
Phenolglucuronic acid	"	"	0.42	0.75	5.7
(Incubation 37° 12 hours)					
Phloroglucinolglucuronic acid	"	3	0.08	0.16	1.9
	5.3	"	0.05	0.11	1.3
(Incubation 37° 15 hours)					

Hence in this case some other solvent has to be applied. Alcohol and acetone are very toxic as already mentioned. The effect of glycol and glycerol on the enzyme activity was tested, using β -mentholglucuronic acid as the substrate.

Various mixtures containing glycerol or glycol were incubated, which are seen in table IX, at 37°C. for 14 hours. In the control experiment 2 cc. water was used instead of glycerol or glycol. The blank tests were carried out by replacing β -mentholglucuronic acid solution with 1 cc. of water.

For analysis was used 1 cc. of the non-protein filtrate. Glycol depresses the activity more intensively than glycerol. 1 cc. of the latter was, accordingly, selected to hold the α -mentholglucuronic acid in solution. 1 cc. of α -mentholglucuronic acid solution (24 mg sodium salt were dissolved in 1 cc. water), 1 cc. of enzyme solution, 1 cc. of glycerol, 2 cc. of buffer solution and a drop of toluene were mixed together in a stoppered tube. The pH of the mixture was regulated by buffer solutions used in the experiment in table II. The mixture was kept at 37°C. for 12 hours, and then neutralized

TABLE IX.
Incubation 37°C. 14 h.

	I	II	III	IV (check experiment)	V
β -mentholglucuronic acid sol. (cc.)	1	"	"	"	"
double conc. citrate buffer sol. (Walbum, pH. 5.3) (cc.)	1	"	"	"	"
Glycerol (cc.)	2	—	—	—	—
50% Glycerol (cc.)	—	2	—	—	—
Glycol (cc.)	—	—	2	—	—
50% Glycol (cc.)	—	—	—	2	—
Water (cc.)	—	—	—	—	2
Enzyme sol. (cc.)	1	"	"	"	"
Filtrate taken for analysis (cc.)	1	"	"	"	"
n/200 Ferrieyanide sol. reduced (cc.)	0.22	0.54	0.20	0.34	1.68
Glucuronic acid set free	(mg)	0.36	0.96	0.36	3.0
	(%)	2.7	7.3	2.7	22.7

with 0.2 n. or 0.1 n. NaOH or of 0.1 n. HCl, and the total volume was made up to 6 cc. with water and finally deproteinized. For analysis 1 cc. was taken. But no hydrolysis was recognized at any pH. In the control experiment, where α -mentholglucuronic acid solution of the mixture at pH 5.3 was replaced by an equal quantity of β -mentholglucuronic acid solution, 1 cc. filtrate reduced 0.41 cc. of n/200 ferricyanide solution. This corresponds to 0.73 mg in the total (5.3%). There is probably not present in the solution any enzyme which hydrolyses α -conjugated glucuronic acids.

IX. Does the enzyme hydrolyse glucosides?

a) β -mentholglucoside.

2 cc. of buffer solution at various pH (2.3–8.6), 0.5 cc. glycerol solution of β -mentholglucoside (4.56%), 1.5 cc. water and 1 cc. of the enzyme solution were mixed together and placed in an incubator at 37°, after the addition of one drop toluene. After 24 hours, it was neutralized and deproteinized as in experiment in VIII). 1 cc. filtrate was used for analysis. The check experiment was exerted at pH 5.3 with β -mentholglucuronic acid instead of β -mentholglucoside and it was found that 1 cc. filtrate reduced 0.94 cc. of $n/200$ ferricyanide solution, i.e. 1.68 mg free glucuronic acid (12.7%) was set free, but no hydrolysis of the glucoside was observed at any pH.

b) β -Phenolglucoside.

In this case, no glycerol is needed. For 0.5 cc. glycerol solution of β -mentholglucoside, 1.5 cc. water and 1 cc. of the enzyme solution in the previous experiment were 1 cc. watery solution of β -phenolglucoside (1.74%) and 2 cc. of the enzyme solution applied. The control experiment was made with β -phenolglucuronic acid instead of with phenolglucoside. The mixture was incubated for 22 hours. The non-protein filtrate was extracted with ether. In the control experiment 0.5 cc. reduced 1.94 cc. of $n/200$ ferricyanide solution which correspond to 6.92 mg of free glucuronic acid (52.4%) in the total.

At pH 4.7 and 5.3 β -phenolglucoside was hydrolysed to a minute extent¹⁾ (Table X). Probably the optimum pH is round 5.3.

c) α - and β -methylglucosides.

No glycerol is necessary also here. The quantitative ratio of the mixed solutions were the same as in the foregoing experiment. The methylglucoside sol. was prepared so as to contain 13.2 mg of the substance in 1 cc. The experiment was tried in this case merely

1) The quantity of glucose set free was calculated by dividing the reduced volume of $n/200$ ferricyanide solution with the factor 6.

TABLE X.

Enzyme sol. 2 cc.
 Buffer solution 2 cc.
 β -Phenolglucoside sol
 (in checkexperiment β -phenolglucuronic acid sol) 1 cc.
 Incubation 37°C. 22 hours.

pH	2.3	3.7	4.7	5.3	6.0	6.7	7.7	8.6	(Checkexp.) 5.3
Extracted filtrate taken for analysis (cc.)	1	"	"	"	"	"	"	"	0.5
$n/200$ Ferrieyanide sol. reduced (cc.)	0	0	0.03	0.05	0	0	0	0	1.87
Glucose or glucuronic acid set free { (mg) (%)			0.05 0.4%	0.08 0.7%					6.68 50.6

at pH 5.3. Incubation was continued for 12 hours at 37°C. In the check experiment with β -mentholglucuronic acid, 1 cc. of the non-protein filtrate reduced 3.3 cc. of $n/200$ ferricyanide solution which correspond to 5.89 mg free glucuronic acid (46% hydrolysis) in the total. But none of the glucosides was hydrolysed at all.

d) α -mentholglucoside.

22.8 mg α -mentholglucoside was suspended in the mixture of 2 cc. glycerol, 1 cc. of twice concentrated citrate buffer solution at pH 5.3, 2 cc. of the enzyme solution and one drop of toluene. The suspension was kept at 37°C. for 12 hours with occasional shaking. In the control experiment, half the volume of double concentrated enzyme solution was used in order to add 1 cc. β -mentholglucuronic acid solution without increasing the total volume. β -mentholglucuronic acid was hydrolysed to the extent of 4.5%, but no α -mentholglucoside was found hydrolysed.

X. The specificness of the enzyme action is not altered by the accompanying substances in emulsin specimen (E. Merck).

Emulsin sol (40 mg in 1 cc.) was heated at 80°C. for 10 minutes in a stoppered tube and quickly cooled. It was then added to with 2 cc. of the enzyme solution, 1 cc. of the twice conc. citrate buffer solution at various pH (Walbum), 1 cc. β -methylglucoside solution (13.2 mg in 1 cc.) and finally one drop of toluene. The mixture was kept at 38°C. for 14 hours. It was neutralized, deproteinized, and the reduction power was determined as already tried. One control experiment was made at pH 4.0 by replacing the enzyme solution with 2 cc. water, and the other at pH 5.3 and by using β -mentholglucuronic acid and water instead of β -methylglucoside and emulsin solution respectively. In the former case 0.13 mg glucose and in the latter 6.3 mg glucuronic acid were set free, that is, the emulsin was inactivated in a large part and the enzyme applied was very active. According to table XI, however, no more hydrolysis of the methylglucoside was observed at any pH than that by the heated emulsin alone.

TABLE XI.

Emulsin solution (In checkexp. II, water) 1 cc. Enzyme sol. (double concentrated) 2 cc. (in checkexp. I, water) 1 cc. Buffer sol. (double concentrated, Walbum) β -Methylglucoside sol. (13.2 mgm 1 cc.) (In checkexp. II β -mentholglucuronic acid sol.) 1 cc. Incubation 38°C. 14 hours.								
pH	3.0	4.0	5.0	5.3	6.0	6.7	(Checkexp I) 4.0	(Check exp. II) 5.3
Filtrate taken for analysis (cc.)	1	"	"	"	"	"	"	"
n/200 Ferricyanide sol reduced (cc.)	0.03	0.06	0.04	0.05	0.07	0.05	0.08	3.6
Glucose or glucuronic acid set free (mg)	0.05	0.1	0.07	0.08	0.12	0.08	0.13	6.3

It does not seem therefore, that the difference in the specifiveness between the present enzyme and emulsin is due to the accompanying substances.

CONCLUSION.

From the above experiments, the author came to the conclusion that there exists most probably a special enzyme in the animal body which is to be termed " β -glucuronosidase".

Thanks are due to Prof. K. Kodama for his criticisms and encouragement.

REFERENCES.

- Bergmann, M. u. Wolff, W. W. (1923): Ber. d. dtsh. chem. Ges., **56**, 1060.
Masamune, H. (1933): J. of Biochemistry, **18**, 259.
(1933): „ **18**, 277.
Röhmman, F. (1908): Biochemie, Verl. v. Julius Springer, Berlin, 197.
Sera, Y. (1913): Hoppe-Seyler's Z. f. physiol Chem., **88**, 460.
(1914): „ **90**, 258.
(„): „ **92**, 261.

It does not seem likely, that the difference in the position
between the present system and system as now in the majority
of the country.

CONCLUSIONS

From the above arguments, the author comes to the conclusion
that there exists most probably a "latent" tendency in the medical
body which is to be termed "reformism".
Thanks are due to Prof. Dr. K. Schmidt for his criticism and
encouragement.

LITERATURE

- BRUNNEN, H. & WALT, W. (1901) Die Medizinische Fakultät der
Universität zu Bonn, 4. Aufl. (1901).
BRUNNEN, H. (1901) Die Medizinische Fakultät der
Universität zu Bonn, 4. Aufl. (1901).
BRUNNEN, H. (1901) Die Medizinische Fakultät der
Universität zu Bonn, 4. Aufl. (1901).
BRUNNEN, H. (1901) Die Medizinische Fakultät der
Universität zu Bonn, 4. Aufl. (1901).

印 檢



Contents

No. 2, March, 1934.

HAYASHI, Katsuzo. Untersuchungen über elektrische Erscheinungen der Hornhaut. III. Elektrische Ladung der Hornhaut	173
IV. Der Isoelektrische Punkt d. Hornhaut und Schlussbetrachtung	185
TODA, Kuni. Über die Spaltung des Cholins im Organismus	201
INUTSUKA, Mamoru. Beiträge zur Kenntnis des Kohlenhydratstoffwechsels	217
TSUNOO, MACHIDA und KUSUI. Über die Abführwege der in der Leber produzierten Substanzen in die Blutbahn. I. Vergleichende Betrachtung d. Harnstoffgehaltes im Blute u. in der Lymphe	231
II. Vergleichende Betrachtung d. Zuckergehaltes in Blut, Lymphe und Galle	237
KURAMOTO, Tsuneo. Einfluss der Gallensäure auf die Wasserstoffionenkonzentration des Harns	245
MAKINO, Hiroshi. Beiträge zur Kenntnis der Taurocholsäure aus Fishgalle	249
SHIMADA, Jitsuichi. Studies in experimental scurvy. XVII. On the ability of glycuronic acid formation in the body of guinea pigs fed on a vitamin C free diet	253
XVIII. On the carbohydrate tolerance of guinea pigs fed on avitamin C free diet, and changes in the blood sugar content of the animals after the parenteral administration of adrenalin and insulin	257
NAKASHIMA, Teiji. Chemische Untersuchungen über die Entstehung des Naphtalin-Katarakte	281
KURAMOTO, Tsuneo. Beiträge zur Kenntnis der Glykogenbildung der Leber durch Gallensäure	315
KAWABE, Kinji. Biochemical studies on carbohydrates. III. Micro-methode for determination of glucosamine in blood, tissue and urine...	319
MIYAZAKI, Masaki. Studies on secretagogues in gastric juice of dog..	329
TOMIYAMA, Tetuo and HANADA, Minoru. The distribution of methionine in several proteins of feeding-stuffs and casein	345
MASAMUNE, H. Biochemical studies on carbohydrates. IV. On an enzyme which catalyses the hydrolysis of biosynthetic osides of glucuronic acid	353